

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/715

A61K 39/395



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03824893. X

[43] 公开日 2005 年 11 月 9 日

[11] 公开号 CN 1694715A

[22] 申请日 2003.9.4 [21] 申请号 03824893. X

[30] 优先权

[32] 2002. 9. 4 [33] US [31] 60/408,126

[86] 国际申请 PCT/US2003/027975 2003.9.4

[87] 国际公布 WO2004/030613 英 2004.4.15

[85] 进入国家阶段日期 2005.4.30

[71] 申请人 路易斯维尔大学研究基金会

地址 美国肯塔基州

[72] 发明人 戈登·D·罗斯

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

权利要求书 2 页 说明书 71 页 附图 26 页

[54] 发明名称 使用 β 葡聚糖和抗体治疗癌性的方法

[57] 摘要

本文涉及使用中性可溶性葡聚糖和单克隆抗体治疗癌症的方法。中性可溶性 β (1, 3; 1, 6) 葡聚糖通过与 C3 补体蛋白受体 CR3 相结合而加强先天免疫系统杀灭肿瘤的活性。葡聚糖并不会诱导炎症细胞因子。本文还涉及将全葡聚糖颗粒用作免疫调节剂的方法, 其中全葡聚糖诱导 Th2 应答向 Th1 应答转变, 从而使细胞毒性 T 细胞的抗癌应答更加强烈。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种抑制或消灭肿瘤细胞的方法，该方法包括对需要治疗的个体使用有效剂量的中性可溶葡聚糖以及至少一种可激活补体的抗肿瘤抗体，其中葡聚糖并不诱导炎性细胞因子，葡聚糖和抗体将抑制或消灭肿瘤细胞。
2. 如权利要求 1 中所述的方法，其中的抗体是通过直接使用单克隆抗体或多克隆抗体而引入的，或者是个体通过癌症疫苗所产生的。
3. 如权利要求 1 中所述的方法，其中的抗体选自：曲妥单抗、美罗华、西妥昔单抗以及这些单抗的组合物。
4. 如权利要求 1 中所述的方法，其中可溶性 β -葡聚糖非经肠胃给药。
5. 一种治疗赘生细胞的方法，该方法包括对赘生细胞使用有效治疗剂量的中性可溶性葡聚糖以及可以激活补体的抗体，该抗体对赘生细胞具有特异性，其中葡聚糖不会引发炎性细胞因子。
6. 如权利要求 5 中所述的方法，其中葡聚糖和抗体会减缓赘生细胞的生长速度。
7. 如权利要求 5 中所述的方法，其中葡聚糖的抗体会阻止赘生细胞的生长。
8. 如权利要求 5 中所述的方法，其中葡聚糖和抗体可延长赘生细胞宿主的存活期。

9. 一种免疫调节方法，在该方法中，通过使用有效治疗剂量的全葡聚糖颗粒可引发 Th2 反应向 Th1 反应的转变。
10. 一种用于治疗癌症的免疫调节方法，在该方法中，通过使用有效治疗剂量的全葡聚糖颗粒可引发 Th2 反应向 Th1 反应的转变。
11. 如权利要求 10 中所述的方法，其中免疫调节增强抗肿瘤疗法的疗效。
12. 如权利要求 10 中所述的方法，其中抗肿瘤疗法包括：对需要治疗的个体使用有效治疗剂量的中性可溶性葡聚糖以及能够激活补体的抗体，该抗体以所述肿瘤细胞的抗原为靶目标；其中抗体通过服用适当的疫苗，或者通过直接使用单克隆抗体或多克隆抗体而被引入。
13. 使用含有中性可溶性葡聚糖和能够激活补体的抗体的组合物来制造用于治疗赘生细胞的药物，其中该组合物减缓赘生细胞的生长速度，葡聚糖不会引发炎症性细胞因子。
14. 如权利要求 1 中所述的方法，其中的中性可溶性葡聚具有单螺旋结构、三链螺旋结构或这两种结构的混合结构。
15. 一种抑制或消灭肿瘤细胞的方法，该方法包括对需要治疗的个体使用有效治疗剂量的某种组合物，该组合物含有中性可溶性大麦葡聚糖以及至少一种能够激活补体的抗肿瘤抗体，其中该组合物抑制或消灭肿瘤细胞。

使用 β 葡聚糖和抗体治疗癌性的方法

相关申请

本申请要求 60/408, 126 号美国临时申请的权益, 60/408, 126 号美国临时申请于 2002 年 9 月 4 日提交, 该临时申请的全文在此通过引证被并入本文。

政府支持

本发明全部或部分地得到了美国国家健康协会/美国国家癌症协会的 RO1CA86412 号拨款和美国国防部及美国陆军 BC010287 号拨款的支持。美国政府享有本发明的某些权利。

发明背景

β -葡聚糖是一种复合糖, β -葡聚糖通常可从几种物质衍生出来, 这些物质包括酵母、细菌、真菌和谷物。每种 β -葡聚糖都有独特的结构, 在 β -葡聚糖中葡萄糖以不同的方式连接在一起, 从而使不同的 β -葡聚糖具有不同的物理性质和化学性质。举例而言, 由细菌和藻类物质衍生出的 β (1-3) 葡聚糖是线性葡聚糖, 因此这种葡聚糖可用作食品增稠剂。葡聚糖的侧链频率被称为置换程度或分支频率, 侧链频率决定着葡聚糖的二级结构和溶解性。酵母衍生出的 β -葡聚糖带有 β (1-3) 和 β (1-6) 键的支链型葡聚糖, 这种结构增强了这种葡聚糖与巨噬细胞相结合的能力以及这种葡聚糖刺激巨噬细胞的能力。从面包酵母(酿酒

酵母)中提纯出来的 β (1-3; 1-6) 葡聚糖是一种有效的抗感染免疫调节剂。

酿酒酵母的细胞壁主要由 β -葡聚糖构成,这一点决定着酿酒酵母细胞壁的形状和机械强度。虽然酵母最常见的用途是用作食品级微生物,但酵母也是酵母多糖的来源,酵母多糖是一种不溶性的原提取物,它被用来刺激非特异性免疫反应。酵母衍生出的 β (1, 3; 1, 6) 葡聚糖在一定程度上是通过激活先天抗真菌免疫机制来抵御各种目标,从而刺激免疫系统。面包酵母衍生出的 β (1-3; 1-6) 葡聚糖是一种完全由 β (1-3) 键连接的糖(葡萄糖)分子组成的多糖, β (1-3) 键连结的糖分子形成了多糖的骨架结构,骨架结构每隔一段便带有通过 β (1-6) 键连接起来的 β (1-3) 支链。这种多糖被更正式地称为聚-(1-6)- β -D-吡喃葡萄糖基-(1-3)- β -D-吡喃葡萄糖。当来源和分离方法不同时,葡聚糖的结构和功能是不同的。

β -葡聚糖具有多种活性。 β -葡聚糖提高非特异性免疫力和增强抗感染的能力与内毒素相似。早期针对 β (1, 3) 葡聚糖对免疫系统的作用主要以老鼠为研究对象。后来的研究表明, β (1, 3) 葡聚糖对多种其他生物种类同样具有很强的免疫刺激活性,其中的生物种类包括蚯蚓、虾、鱼、鸡、老鼠、兔子、豚鼠、羊、猪、牛和人类。根据这些研究, β (1, 3) 葡聚糖是一类在整进化谱内都有效的免疫刺激剂,有可能表现出抗真菌病原体的先天进化免疫反应。然而,尽管研究人员做了深入的研究调查,但就适合作为免疫刺激剂的 β (1-3) 葡聚糖的来源、大小和形式仍未达成共识。

正如日本医药文献中所述的,有关 β -葡聚糖潜在的抗癌活性研究已经进行了约30年。举例而言,自上世纪70年代末开始,研究人员在动物体内和临床上对蘑菇多糖进行了广泛的研究,其

中动物实验的用药时间为 10 天，用药量为 1 毫克/公斤；临床试验是针对早期及复发性恶性淋巴瘤、结肠直肠癌、乳癌、肺癌和胃癌进行的。最近的报道对这项工作进行了回顾，其主要内容是有关从蘑菇中分离出来的 β -葡聚糖(见 Borchers AT.等人在《蘑菇与免疫》上发表的文章，221 (4)，281 (1999))。这项研究工作表明，从蘑菇中分离出的多糖的抗癌活性在很大程度上是由 T 细胞和巨噬细胞介导的，而 T 细胞和巨噬细胞由 β -葡聚糖所激活。从原酵母和谷物制品中分离出的 β -葡聚糖也表现出了抗癌活性。这些研究工作所使用的是原 β (1, 3) 葡聚糖制品，其中原 β (1, 3) 葡聚糖制品是 β (1, 3) 葡聚糖与其他诸如 β -葡聚糖、甘露聚糖、壳多糖/脱乙酰壳多糖、 β (1, 4) 葡聚糖、核酸、蛋白质以及脂质这些多糖物质的混合物。 β (1, 3) 葡聚糖在这些制品中所占的重量比通常小于 50%。不同种类的葡聚糖在诱导各种细胞反应的能力以及在抗具体癌症的活性上是不同的，尤其在细胞因子表达和细胞因子产生方面存在着差异。人们认为， β -葡聚糖的抗癌机理涉及到巨噬细胞的刺激以及此后炎症介质的释放，比如白细胞间素-1、肿瘤坏死因子以及前列腺素 E2 的释放(见 Sveinbjörnsson 等人在《生物化学生物物理学研究通讯》上发表的文章，223 (3)，643 (1996))。

免疫系统由两个完整系统组成，这两个完整系统是适应性免疫系统和先天性免疫系统。 β -葡聚糖被认为主要是通过相对非特异性的先天免疫系统而发挥作用。先天免疫系统包括补体蛋白、巨噬细胞、中性粒细胞和天然杀伤细胞，先天免疫系统可以在适应性免疫系统发挥作用之前迅速地对感染做出反应。人们已证明 β -葡聚糖微粒和诸如蘑菇多糖以及裂殖菌多糖这样的高分子量可溶性 β -葡聚糖对中性粒细胞和巨噬细胞的交联膜 CR3 是足够大的，这些 β -葡聚糖可触发突发性呼吸、脱粒以及在缺乏靶细胞的情况下释放细胞因子(见 G. D. Ross 等人在《免疫药理

学》上发表的文章, 42, 61 (1999))。另一方面, 中性可溶性 β -葡聚糖并不刺激细胞因子的释放, 最可能的原因是这种 β -葡聚糖对交联膜 CR3 而言太小了。

与癌症生长相关的细微变化会导致表面蛋白的表达不同, 这可以刺激适应性免疫系统做出微弱的反应。表面抗原表达所出现的这些变化还提供了治疗的靶目标, 其中的治疗使用选择性单克隆抗体或抗癌疫苗。已开发出的单克隆抗体以在结肠癌、淋巴瘤、乳腺癌以及急性白血病中表达的各种蛋白为靶目标。肿瘤对单克隆抗体的临床反应的免疫基础包括直接细胞毒性和诱导免疫, 其中抗体依赖型细胞介导细胞毒性和补体介导细胞毒性可直接杀灭肿瘤细胞。然而, 人们已经注意到, 天然抗体或单克隆抗体介导的补体活性的增强对肿瘤的生长几乎没有影响, 其原因在于肿瘤对于补体介导的细胞毒性具有固有的耐受性。这种固有的耐受性会导致单克隆抗体或疫苗对癌症抗原失去治疗效用。单克隆抗体疗法受效应机理(即生长因子受体的对抗作用、抗体依赖型细胞介导的细胞毒性)的限制。

使用诸如赫塞汀TM(曲妥单抗)和 B 细胞单克隆抗体TM(美罗华)这些人源化单克隆抗体的肿瘤免疫疗法目前对于分别患有 Her-2/neu⁺转移性乳癌和 B 细胞淋巴瘤的患者而言是可接受的临床疗法(见 Wang S. C.等人在《生殖系统肿瘤学》上发表的文章, 28: 21-29, 2001; 见 Leyland-Jones B 在《柳叶刀肿瘤学》上发表的文章, 3: 137-144, 2002; 见 Leyland-Jones B.在《柳叶刀肿瘤学》上发表的文章, 3: 137-144, 2002; 见 Johnson P.和 M. X. Sliwkowski 在《肿瘤学》上发表的文章, 63 增刊 1: 17-24(2002); 见 Johnson P.和 M. Glennie 在《生殖系统肿瘤学》上发表的文章, 30: 3-8 (2003); 见 Plosker G. L.和 D. P. Figgitt 在《药物》上发表的文章, 63: 803-843 (2003); 见 Ross J. S.等人在《Am.临床

病理学杂志》上发表文章, 119: 472-485 (2003))。基于成功的记录, 其他几种人源化单克隆抗体正在开发过程中, 其中某些单克隆抗体, 比如 ErbituxTM (西妥昔单抗) 即将获得联邦药物管理局的最终批准。然而, 抗体疗法不总是有效的, 即使对于肿瘤表达为高表面密度的目标肿瘤抗原的患者而言也是如此。被认为引起肿瘤退化的效应机理是可变的, 效应机理尤其包括生长抑制因子活性以及抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。一般不认为补体依赖性细胞毒性属于效应机理范畴, 补体依赖性细胞毒性在肿瘤退化中是否起到重要作用仍是一个具有争议的问题。体外研究表明, 补体依赖性细胞毒性受补系统膜调节因子的限制, 比如受 CD55 和 CD59 的限制, 这些膜调节因子偶尔会在肿瘤上出现过度表达。此外, 用来对抗微生物病原体的主要补体介导效应机理、C3 受体依赖性吞噬作用以及细胞毒性脱粒完全没有抗癌效果。基于人类免疫球蛋白 G1 的抗肿瘤单克隆抗体可以激活诸如曲妥单抗、美罗华或西妥昔单抗这样的补体, 使用基于人类免疫球蛋白 G1 的抗肿瘤单克隆抗体, 一层 IC3b 会沉积在可被白细胞 ic3b 受体 CR3 (Mac-1、CD11b/CD18、 $\alpha_M\beta_2$ -整联蛋白) 识别的肿瘤细胞上。然而, 触发 CR3 依赖性白细胞 (中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、天然杀伤细胞) 介导的细胞毒性需用 CR3 即与 ic3b 相结合又要与凝集素位点相结合。由于肿瘤细胞并不表达 CR3 激活的多糖, 所以这些肿瘤细胞可避开这种有效抵抗微生物病原体的保护机理。

人们越来越认识到, 免疫系统有效地破坏肿瘤需要多种效应机理的协同作用。因此, 一种疫苗、细胞因子或生物学应答调节物不可能在众多患者中取得成功。举例而言, 疫苗可诱导免疫细胞毒性 T 淋巴细胞反应和/或体液抗体反应, 但每种反应都存在缺陷。抗体通常是无效的, 因为诸如 DAF、MCP 以及 CD59 这样的正常宿主细胞蛋白会抑制补体介导的细胞毒性。此外, ic3b

对肿瘤的调理作用并非只吸收巨噬细胞或天然杀伤细胞。因为肿瘤中免疫球蛋白 G 浓度太低以及抗体 FC 片段介导的细胞毒性受到天然杀伤细胞对 I 型 MHC 肿瘤细胞识别作用的抑制，所以抗体依赖性细胞介导的免疫力被认为是无效的。做为转移过程的一部分，由于肿瘤通常会失去抗原表达所需的主要组织相容性复杂分子，所以使用细胞毒性 T 淋巴细胞的细胞介导免疫性也存在缺陷。因此，需要一种抗癌疗法，这种抗癌疗法可以克服上述提到的各种缺陷。

发明概述

本发明与使用中性可溶性 β (1, 3) 葡聚糖和疫苗或单克隆抗体治疗肿瘤的方法相关。本文还描述了将 β -葡聚糖作为肿瘤单克隆抗体疗法的辅药从而产生白细胞 CR3 依赖性杀灭肿瘤机理的方法；这种机理与所有其他效应机理相累加。本文特别对含有可溶性 β -葡聚糖和激活补体的肿瘤特异性抗体的组合物抗肿瘤活性进行了说明。在某些实施方案中，这些抗体是 I 亚型免疫球蛋白 G 或 III 亚型免疫球蛋白 G。本文所述的可溶性葡聚糖在不激活炎性细胞因子从而造成有害影响的情况下可激活免疫系统。此外，本文还涉及某些方法，这些方法与单股结构的中性可溶性葡聚糖相关，这一葡聚糖在不诱导炎性细胞因子的情况下可激活先天免疫系统。通过使用适当的疫苗还可在患者体内诱导这些抗体或通过使用单克隆抗体或多克隆抗体而直接向患者提供这些抗体，比如通过静脉注射单克隆抗体而直接向患者提供这些抗体。

本文还对不可溶性 β (1, 3) 葡聚糖（全葡聚糖颗粒）的应用进行了说明，其中不可溶性 β (1, 3) 葡聚糖被用作免疫调节剂，它诱导 Th2 反应向 Th1 反应的转变，并增强细胞毒性 T 细胞的抗肿瘤反应。

抗体介导的杀灭肿瘤细胞机理的核心部分涉及到 C3 补体蛋白对抗体-肿瘤抗原络合物的识别以及 C3-抗体肿瘤抗原络合物的形成。该络合物随后被先天免疫细胞通过 CR3 所识别。先天免疫细胞带有 CR3 受体,并通过 CR3 和 CR3-抗体肿瘤细胞抗原络合物之间的特异性反应将肿瘤细胞认作异质物。当 CR3 与该络合物相结合时,先天免疫细胞受到刺激,从而发挥其杀灭肿瘤的活性。在本发明中,这些先天免疫细胞还受到含有中性可溶性葡聚糖的组合物的刺激。当中性可溶性葡聚糖在单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和天然杀伤细胞的表面与 CR3 相结合后,这些细胞便处于激活状态。中性可溶性葡聚糖-CR3 相互作用对这些细胞的激活作用增强了这些细胞以 C3-抗体-肿瘤细胞抗原络合物为靶目标的杀灭肿瘤活性,从而加强了杀灭肿瘤的能力。在某些实施方案中,这种作用具有协同效果。

本发明的一个新颖的方面是中性可溶性葡聚糖与激活补体的抗体抗肿瘤活性,其中的中性可溶性葡聚糖来自于任何 β (1, 3) 葡聚糖来源。以中性可溶性葡聚糖形式存在的 β 葡聚糖具有的优势是可以容易地从任何 β 葡聚糖源制得高纯度的 β 葡聚糖。将中性可溶性葡聚糖用作抗肿瘤药剂有多个重要的方面。第一,使用高纯中性可溶性葡聚糖可使葡聚糖的活性更高、副作用更少。第二,葡聚糖可以与凝集素的 CR3 结合区相结合,从而激活先天免疫细胞的杀灭肿瘤活性。通过使用补体沉积所产生的定向激活作用, β 葡聚糖同时通过直接细胞毒性作用以及细胞因子介导的局部补充免疫细胞而提高免疫系统清除肿瘤的能力。最后,单股结构的中性可溶性葡聚糖可在不诱导炎性细胞因子的情况下激活先天免疫系统。

本文对抑制或杀灭肿瘤细胞的方法进行了说明,这些方法包括对需要治疗的个体使用有效治疗剂量的中性可溶性葡聚糖以

及至少一种激活补体的抗肿瘤抗体，其中葡聚糖不会诱导炎性细胞因子，葡聚糖和抗体可抑制或杀灭肿瘤细胞。

抗体可通过直接使用单克隆抗体或多克隆抗体而进行给药，或者由个体身体在癌症疫苗的作用下而产生。在某些实施方案中，抗体选自于曲妥单抗、美罗华、西妥昔单抗以及这些抗体的组合物。在其他实施方案中，可溶性 β -葡聚糖是通过注射方式进行给药的，在某些实施方案中，中性可溶性葡聚糖具有单螺旋构造、三链螺旋构造或同时具有这二种构造。

本文还对治疗赘生细胞的方法进行了说明，该方法包括对赘生细胞使用有效治疗剂量的中性可溶性葡聚糖以及以对赘生细胞具有特异性的激活补体抗体；其中葡聚糖并不诱导炎性细胞因子。在某些实施方案中，葡聚糖和抗体会减缓赘生细胞的生长速度和/或抑制赘生细胞的生长和/或延长赘生细胞宿主的存活时间。

本文还对免疫调节的方法进行了说明，在这些免疫调节方法中，通过使用有效剂量的全葡聚糖颗粒而诱导 Th2 反应向 Th1 反应的转变。在用于治疗癌症的免疫调节中，通过使用有效剂量的全葡聚糖颗粒而诱导 Th2 反应向 Th1 反应的转变。在某些实施方案中，免疫调节增强抗肿瘤疗法的疗效。

本文还对使用含有中性可溶性葡聚糖和激活补体的抗体的组合物制造药物进行了说明，这种药物用来治疗赘生细胞，其中这一组合物将减缓赘生细胞的生长，葡聚糖不会诱导炎性细胞因子。

在其他实施方案中，抑制或杀灭肿瘤细胞的方法包括对需要治疗的个体使用有效剂量的一种组合物，该组合物含有中性可溶

性大麦葡聚糖和至少一种激活补体的抗肿瘤抗体，其中的组合物可抑制或杀灭肿瘤细胞。

图示简介

通过对本发明优选实施方案进行更详细说明，人们将清楚地了解前面所述的本发明的目标、特点和优势以及本发明其他的目标、特点和优势。本文所附的图形对这些优选实施方案进行了图解说。

图 1 表明的是 C3 调理的酵母在激活 CR3 时同时需要 iC3b 和 β -葡聚糖与凝集素位点相结合。

图 2 表明的是缺乏细菌的 β -葡聚糖并不通过 CR3 触发吞噬作用或脱粒作用。

图 3 表明的是可溶性 β -葡聚糖与 CR3 相结合并启动受体，从而触发细菌的脱粒和解体或 iC3b 的肿瘤靶细胞的脱粒和解体。

图 4 表明的是启动鼠源性中性粒细胞 CR3 的 β -葡聚糖可使 iC3b 调理的乳腺肿瘤细胞在此后触发细胞毒性。

图 5A-5D 表明的是乳房肿瘤患者的肿瘤细胞针对免疫球蛋白 M、免疫球蛋白 G 或 C3 所做的流式细胞检测分析。图 5A 是抗老鼠-免疫球蛋白 G-PE/MiG-异硫氰酸荧光素的图形。图 5B 是抗 MUC1-PE/抗免疫球蛋白 M-异硫氰酸荧光素的图形。图 5C 是抗 MUC1-PE/抗免疫球蛋白 M-异硫氰酸荧光素的图形。图 5D 是抗 MUC1/抗 C3-异硫氰酸荧光素的图形。

图 6 表明的是新切除的原发乳腺肿瘤细胞的悬浮液中含有足够的 C 3，同种基因的天然杀伤细胞对肿瘤细胞的识别需要足够的 C 3，其中的天然杀伤细胞带有 β -葡聚糖启动的 CR3。

图 7 表明的是 β -葡聚糖对 Balb/c 小鼠 Ptas64 乳腺癌的治疗结果。

图 8 表明的是 β -葡聚糖在治疗缺乏血清 C 3 或白细胞 CR3 的小鼠时失效的情况。

图 9 表明的是使用 β -葡聚糖可增强抗肿瘤单克隆抗体疗法对 EL-4 肝淋巴瘤的疗效。

图 10 表明的是在治疗裸小鼠体内人类 LAN-1 成神经细胞瘤时，抗体和口服大麦 β -葡聚糖所取得的协同疗效。

图 11A 和图 11B 是静脉注射酵母 β -葡聚糖（图 11A）和口服大麦 β -葡聚糖（图 11B）情况下对 RMA-S 淋巴瘤实施单克隆抗体疗法的疗效比较。

图 12 表明的是在静脉注射单克隆抗体加口服酵母 β -葡聚糖颗粒的情况下 Balb/c 小鼠乳腺癌的治疗结果。

图 13 表明的是 β -葡聚糖刺激天然杀伤细胞分泌肿瘤坏死因子 α 和 CR3 依赖性刺激天然杀伤细胞分泌肿瘤坏死因子 α 。

图 14A-图 14E 表明的是对乳腺癌小鼠采用口服酵母 β -葡聚糖颗粒疗法可将肿瘤诱导的 Th2 反应转化为 Th1 反应。图 14A 表明的是来自没有肿瘤的小鼠的血液情况。图 14B 表明的是 T 细胞正在生成白细胞间素-4。图 14C 表明的是两只小鼠在植入肿瘤细胞后 12 天的血液情况。图 14D 表明的是 T 细胞已经停止生

成白细胞间素-4。图 14E 表明的是两只小鼠在植入肿瘤细胞并采用酵母 β -葡聚糖治疗 2 天后的血液情况。

图 15 表明的是在共同使用 3F8 免疫球蛋白 G3 抗 GD2 神经节苷酯单克隆抗体和 β -葡聚糖时可加强 EL-4 肝淋巴瘤的退化。在如在本文“材料和方法”一节中所述的，在小鼠体内通过注射方式植入 EL-4 细胞，从而使小鼠生成肝脏肿瘤，10 天后用单克隆抗体和/或 β -葡聚糖进行治疗。在治疗两星期后取出小鼠的肝脏并进行称量，然后与没有肿瘤的小鼠肝脏进行比较。图 15 中列出了平均值 \pm 标准误差。

图 16 表明的是，在采用 14.G2a 抗 GD2 神经节苷酯的免疫球蛋白 G2a 及 β -葡聚糖共同治疗后，RMA-S 肝淋巴瘤小鼠的存活期得到了延长。正如本文“材料和方法”一节所述的，通过注射方式向小鼠体内注入 RMA-S 肿瘤细胞，从而使小鼠生成肝脏肿瘤，注射 5 天后对小鼠采用单克隆抗体和/或 β -葡聚糖治疗。治疗延续 3 个星期，然后记录小鼠的存活期。

图 17A-图 17C 表明的是，在同时使用酵母 β -葡聚糖时，乳腺肿瘤和皮下肿瘤的消退速度比单独使用单克隆抗肿瘤抗体时有显著的增长。图 17A-图 17C 表明了三种不同疗法的情况。图 17A 表明的是 11C1 抗小鼠乳房肿瘤病毒单克隆抗体与葡聚糖联合使用对 Ptas64 肿瘤的治疗。图 17B 表明的是静脉注射 14.G2a 抗 GD2 单克隆抗体与葡聚糖联合使用时对 RMA-S-MUC1 的治疗。图 17C 表明的是静脉注射 BCP8 抗 MUC1 单克隆抗体与葡聚糖联合使用时对 RMA-S-MUC1 的治疗。在植入肿瘤细胞后 5-9 天不要用药，从而生成小的肿瘤体，然后进行为期 14 天的免疫治疗。3 个星期后测定肿瘤的大小并监测存活时间（存活期数据列于图 18A-18C 中）。图 17A 表明的是抗小鼠乳房肿瘤病毒的 11C1 免疫球蛋白 G2a 单独使用以及与中性可溶性 β -葡聚糖联合

使用时对 Blab/c 小鼠 Ptas64 乳腺癌的治疗情况。无论是单独使用 11C1 单克隆抗体还是单独使用中性的可溶性 β -葡聚糖（每天 300 微克），肿瘤均出现了一定程度的消退，但在中性的可溶性 β -葡聚糖与 11C1 单克隆抗体联合使用时，肿瘤的消退程度明显好于单独使用 11C1 单克隆抗体治疗时的程度（ $p < 0.05$ ）。在图 17B 和图 17C 中，C57BL/6 小鼠通过皮下植入方式被植入 RMA-S-MUC1 肿瘤细胞，并在植入 5 天后使用 14.G2a 抗 GD2 神经苷酯和/或中性的可溶性 β -葡聚糖（每天 300 微克）或抗 MUC1 的 BCP8 免疫球蛋白 G2b 和/或中性的可溶性 β -葡聚糖（每天 300 微克）进行治疗。无论使用其中那种单克隆抗体，在与中性的可溶性 β -葡聚糖联合使用时，肿瘤的消退程度都明显好于单独使用单克隆抗体进行治疗时肿瘤的消退程度。图中列出了平均值和平均标准误差。

图 18A-图 18C 表明的是，在抗肿瘤单克隆抗体与可溶性 β -葡聚糖联合使用的情况下，延长了接受治疗小鼠的存活期。图 18A 表明的是抗小鼠乳房肿瘤病毒的 11C1 单克隆抗体与葡聚糖联合使用治疗 Ptas64 肿瘤的结果。图 18B 表明的是静脉注射 14.G2a 抗 GD2 单克隆抗体联合使用葡聚糖对 RMA-S-MUC1 进行治疗的结果。图 18C 表明的是静脉注射 BCP8 抗 MUC1 单克隆抗体联合使用葡聚糖对 RMA-S-MUC1 进行治疗的结果。这些数据构成了图 17A-图 17C 中所表明肿瘤治疗方法的存活曲线。

图 19A-图 19B 表明的是中性的可溶性 β -葡聚糖所介导的增强肿瘤退化作用需要白细胞 CR3，在缺乏 CR3（CD11b^{-/-}）小鼠中不能达到增强肿瘤消退的效果。图 19A 表明的是肿瘤直径与野生型小鼠疗效之间的关系。图 19B 表明的是肿瘤直径与缺乏 CR3 小鼠治疗之间的关系。野生型小鼠和对比小鼠通过皮下植入方式被植入 RMA-S-MUC1 肿瘤细胞（ 2×10^6 个），对比组小鼠是缺乏 CR3 的 C57BL/6 小鼠；肿瘤细胞植入后在小鼠体内生长 10 天以

上,从而使肿瘤直径达到 5-6 毫米,然后进行为期 21 天的免疫治疗。在规定的时间内对肿瘤进行测量(图 19A-图 19B),并对小鼠的存活期进行监测(图 20A-图 20B)。小鼠接受抗 GD2 神经节苷酯的 14.G2a 单克隆抗体(每隔 2 天使用 100 微克)和/或中性可溶性 β -葡聚糖(每天 400 微克)。单独使用单克隆抗体治疗时,缺乏 CR3 小鼠和野生型小鼠的肿瘤消退速度没有差别,在缺乏 CR3 小鼠中没有出现 β -葡聚糖导致的单克隆体介导的肿瘤加速消退作用。虽然 β -葡聚糖导致的单克隆抗体介导的肿瘤加速消退现象并不明显,但 β -葡聚糖的确显著延长了单克隆抗体介导的存活期(图 20A)。图中给出了平均值 \pm 平均值标准误差。

图 20A-图 20B 表明的是,中性可溶性 β -葡聚糖与抗肿瘤单克隆抗体联合治疗可以延长野生型小鼠的存活期(图 20A),但不能延长缺乏 DR3 小鼠的存活期(图 20B)。这些数据构成了图 19A-图 19B 所述治疗方法所对应的存活期曲线。

图 21A-图 21B 表明的是,当与抗肿瘤单克隆抗体联合使用时,中性可溶性 β -葡聚糖介导的肿瘤加速消退过程需要原生质 C3,在缺乏 C3 的小鼠体内中性可溶性 β -葡聚糖达不到加速肿瘤消退的功效。图 21A 表明的是肿瘤直径与野生型小鼠治疗之间的关系。图 21B 表明的是肿瘤直径与缺乏 C3 小鼠治疗之间的关系。缺乏 C3 ($C3^{-/-}$) 小鼠及野生型小鼠通过皮下移植方式被植入 1×10^6 个转染了人类 MUC1 (LL/2-MUC1) 的路易氏肺癌细胞。在肿瘤生长 7 天后,用抗 MUC1 的 BCP8 免疫球蛋白 G2b 单克隆抗体(每隔 2 天使用 200 微克)和/或中性可溶性 β -葡聚糖(每天 400 微克)对小鼠进行为期 3 周的治疗。单独使用 BCP8 单克隆抗体进行治疗并不能在野生型小鼠或缺乏 C3 的小鼠体内造成肿瘤的明显消退,但 BCP8 单克隆抗体与中性可溶性 β -葡聚糖联合使用时,野生型小鼠体内的肿瘤出现了明显消退,但在缺乏

C3 的小鼠体内没有达到使肿瘤明显消退的效果。图中列出了平均值 \pm 平均值标准误差。

图 22A-图 22B 表明的是可溶性 β -葡聚糖与抗肿瘤单克隆抗体联合使用所导致的存活期延长需要 C3，可溶性 β -葡聚糖和抗肿瘤单克隆抗体的联合使用并不能使缺乏 C3 小鼠的存活期得到延长。图 22A 表明的是肿瘤直径与野生型小鼠治疗之间的关系。图 22B 表明的是肿瘤直径与缺乏 C3 小鼠治疗之间的关系。这些数据构成了图 21A-图 21B 所述肿瘤治疗方案所对应的存活期曲线。

图 23 表明的是乳腺肿瘤生长会诱导白细胞明显的增多。从 Balb/c 对比鼠或在其乳房脂肪垫内植入 1×10^4 Ptas64 肿瘤细胞的小鼠体内收集外周血。使用“材料和方法”一节中所述的流式细胞测定仪测定白细胞的绝对数量。在植入肿瘤细胞后 8 天检测到了明显的肿块。在 8 天后，在患有肿瘤的小鼠体内观察到了白细胞数量明显增多，而对比小鼠体内的白细胞数量正常。图中列出了平均值 \pm 平均值标准误差。

图 24A-图 24E 表明的是，通过静脉注射抗 Gr-1 的 RB6-8C5 单克隆抗体对小鼠进行的治疗会有选择性地消耗粒性白细胞，但不会减少单核细胞、巨噬细胞或树突细胞。正如“材料和方法”一节所述的，首先通过腹腔注射方式向小鼠注射抗 Gr-1 单克隆抗体，然后在 3 天后进行静脉注射，其中静脉注射每隔 3 天重复一次。使用流式细胞测定仪测定正常小鼠（左侧矩形图）血液（图 24A）、脾脏（图 24B）和骨髓（图 24B）中的粒性白细胞数量以及使用抗 Gr-1 治疗的小鼠（右侧矩形图）体内相应的粒性白细胞数量。顶部的两幅矩形图表明，使用抗 Gr-1 单克隆抗体进行治疗可以有效地去除血液和脾脏中的 Gr-1+粒性白细胞，但对骨髓中的 Gr-1+粒性白细胞没有实质性的影响。当未经治疗的对比

小鼠（左侧矩形图）与经过抗 Gr-1 单克隆抗体治疗的小鼠（右侧矩形图）相比时，在区域 2（R2 标识的区域）中的单核细胞（图 24D）没有出现减小。当对比小鼠（左侧矩形图）与经过抗 GR-1 治疗的小鼠（右侧矩形图）进行对比时，脾巨噬细胞的数量也没有减少。研究人员对骨髓巨噬细胞以及脾树突细胞和骨髓树突细胞进行了类似的研究；同样，没有证据表明经抗 Gr-1 治疗的小鼠出现了上述细胞的减少（未在图中表明）。为了对每种细胞种群进行分析，首先用抗 CD45-PerCP-Cg5.5 进行染色，并建立分析所用的细胞门类，该细胞门类包括所有 CD45+白细胞。

图 25 表明的是，中性可溶性 β -葡聚糖免疫疗法杀灭肿瘤的活性需要粒性白细胞的配合，这种杀灭肿瘤的活性在经抗 Gr-1 单克隆抗体治疗而缺乏粒性白细胞的小鼠体内无法发挥作用。在 Balb/c 小鼠的脂肪垫处植入 Ptas64 乳房癌细胞，使癌细胞生长 7 天，然后用免疫疗法进行治疗。使用 11C1 免疫球蛋白 G2a 抗小鼠乳房肿瘤病毒单克隆抗体和/或中性可溶性 β -葡聚糖（每天 400 微克）对小鼠进行为期 3 星期的治疗。正如本文“材料和方法”一节中所述的，从某些组小鼠的粒性白细胞被消耗掉了。正如在这种肿瘤模型之前所述的（图 17A 顶部图形），在联合使用中性可溶性 β -葡聚糖的情况下，肿瘤消退的程度明显好于单独使用 11C1 单克隆抗体时肿瘤的消退程度（ $P < 0.05$ ，低下的支架符号和星号）。图中给出了平均值 \pm 平均值标准误差。

图 26A-图 26D 表明的是口服大麦 β -葡聚糖可导致肿瘤消退（图 26C）以及与肿瘤消退（图 26A）相似的存活情况（图 26D），还表明了静脉注射酵母 β -葡聚糖情况下的存活情况（图 26B）。

本发明的详细说明

以下是本发明优选实施方案的说明。

本发明申请揭示了抗肿瘤疗法，在这些方法中，中性可溶性 β -葡聚糖与激活补体的抗体联合使用，从而达到抗肿瘤的效果，其中激活补体的抗体直接指向肿瘤抗原。正如本文所用的，中性可溶性葡聚糖是一种中性可溶性葡聚糖的组合物，该组合物主要来自任何葡聚糖源的1,3葡萄糖组成。在某些实施方案中，可溶性酵母 β -葡聚糖由来自酵母的 β （1,3）葡聚糖和 β （1,6）葡聚糖组成。在其他实施方案中，中性可溶性葡聚糖由谷物生成，并含有1,3、1,4键。

在某一实施方案中，该方法利用先天免疫系统和适应性免疫系统的活性，并提供协同效应。这种协同效应在一定程度上源自于抗体选择肿瘤细胞作为靶细胞的能力，而中性可溶性葡聚糖通过利用C3沉积作用来增强通常较弱的体液反应，其中C3的沉积是由抗体诱导的，带有经 β -葡聚糖启动过的CR3的先天免疫细胞可以识别肿瘤细胞。通过使用 β -葡聚糖可以获得更多的协同效应， β -葡聚糖可特别刺激先天免疫系统或适应性免疫系统，从而充分地利用这两个系统。

本发明所说明的包括：以肿瘤抗原为目标的单克隆抗体疗法和抗肿瘤疫苗可以刺激抗癌免疫活性，而高纯可溶性葡聚糖可以增强这种抗癌免疫活性。细胞表面单克隆抗体和肿瘤疫苗刺激复合的抗肿瘤免疫反应，这种复合免疫反应包括非特异性免疫反应和特异性免疫反应。非特异性免疫反应涉及先天免疫细胞因子（即补体系统）和多种细胞（树突细胞、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和天然杀伤细胞）。以肿瘤抗原为目标的单克隆抗体和肿瘤疫苗所激发的抗体与肿瘤细胞的表面相结合，从而产生直接的补体作用和补体介导的细胞毒性。

抗体介导的杀灭肿瘤细胞这一机理的关键部分涉及C3补体蛋白对抗体-肿瘤抗原络合物的识别以及C3-抗体-肿瘤抗原络合

物的形成。这一络合物随后被先天免疫细胞通过 CR3 而识别。先天免疫细胞带有 CR3 受体，并通过 CR3 和 C3-抗体-肿瘤细胞抗原络合物之间的特异性相互作用而将肿瘤细胞识别为异质体。当 CR3 与该络合物相结合时，先天免疫细胞受到刺激，从而发挥它们的杀灭肿瘤活性。在本发明中，这些先天免疫细胞还受到中性可溶性葡聚糖的刺激。当可溶性 β (1,3; 1,6) 葡聚糖在单核细胞、巨噬细胞和天然杀伤细胞的表面与 CR3 相结合时，这些细胞便被激活。这些细胞被 β (1,3; 1,6) 葡聚糖与 CR3 间相互作用激活后可增强这些细胞以 C3-抗体-肿瘤抗原络合物为靶目标的杀灭肿瘤活性，从而通过协同作用提高杀灭肿瘤的能力。

除了可以增强先天免疫系统中性可溶性葡聚糖-CR3 介导的杀灭肿瘤活性，使用颗粒葡聚糖的 β -葡聚糖疗法还可以在获得性免疫系统反应中诱导 Th2 反应向 Th1 反应转变。在通常情况下，抗肿瘤的获得性免疫反应不能发生从 Th2 反应（体液/抗体反应）向 Th1 反应（细胞介导的杀伤 T 细胞反应）的转变。因此，获得性免疫系统的全部力量无法用来抵御癌症。然而，全葡聚糖颗粒在使单核细胞/巨噬细胞和 T 细胞循环时可迅速地诱导 Th2 反应向 Th1 反应的转变，这一转变由全葡聚糖颗粒对这些重要免疫细胞的细胞因子外形的影响而得到证明。这种向抗肿瘤的细胞毒性 T 细胞反应的转变会增强获得性免疫系统的抗肿瘤反应，虽然肿瘤细胞可以抵抗补体介导的细胞毒性，但却很容易遭到细胞毒性杀伤 T 细胞反应的破坏。

本发明的另一方面是口服 WGP 具有诱导获得性免疫细胞毒性 T 细胞抗肿瘤免疫反应，而全身使用中性可溶性葡聚糖可通过先天免疫细胞反应来增强细胞表面单克隆抗体和/或肿瘤疫苗疗法的抗肿瘤活性。虽然不为理论所限制，由于 WGP 和中性可溶性葡聚糖具有不同的结构，所以这两种物质作用于不同的细胞群

体。WGP 作用于与消化道相关的淋巴组织和淋巴细胞，而中性可溶性葡聚糖作用于循环的先天免疫细胞。增强先天免疫反应和获得性免疫反应具有协同效应，并可显著增强抗肿瘤活性。

本发明申请还对免疫调节方法进行了说明，在该免疫调节方法中，通过使用有效治疗剂量的全葡聚糖颗粒来诱导 Th2 反应向 Th1 反应的转变。虽然免疫调节可用于抗肿瘤疗法之外的领域，但免疫调节增强抗肿瘤疗法疗效的能力具有特殊的意义。免疫调节方法包括对需要治疗的个体使用有效治疗剂量的全葡聚糖颗粒，并使用以前面所述肿瘤细胞的抗原为靶目标的抗体，其中的抗体是通过对个体使用适当的疫苗而诱导的，或者直接对个体使用单克隆抗体或多克隆抗体。此外，所使用的全葡聚糖可通过口服、注射或其他本领域已知的方式进行给药。葡聚糖和激活补体的抗体可以顺序给药、同时给药或在不同的时间进行给药。

适应性免疫系统之所以这样命名是因为该系统通过对异质体表面上存在的抗原产生特定的反应而对感染进行适应。癌症给免疫系统造成的一个困难是癌症细胞不是真正的异质体，癌症细胞只是各种基因被异常激活或异常失活的天然细胞。因此，一般认为，适应性免疫系统不适合于对付癌症，取而代之的是，癌症通常由先天免疫系统的巨噬细胞、中性粒细胞和天然杀伤细胞进行处理。适应性免疫系统还可分成 Th1 系统和 Th2 系统，这两个分系统是以所涉及到的两类 T 辅助细胞而命名的。这种分系统最初是在小鼠身上发现的，虽然小鼠体内的分系统更简单一些，但人体内也存在着 Th1/Th2 差别。Th1 辅助细胞产生细胞因子，细胞因子可刺激细胞产生较强的免疫力，但只能刺激较弱的并且是十分短暂的抗体反应。另一方面，Th2 辅助细胞可产生一系列的细胞因子，这些细胞因子可引起较强的抗体反应，但导致的细胞免疫力却很弱。虽然 Th1 和 Th2 代表两种不同类型的免疫反应，

但个体对病原体所产生的反应通常包括这两种反应，其中一种反应居于主要地位。令人感兴趣的是，Th1 反应和 Th2 反应是相互对立的，既较强的 Th1 反应会压制 Th2 反应，反之亦然。

酵母衍生出的中性可溶性葡聚糖在一定程度上通过刺激先天抗真菌免疫机理而发挥作用，酵母衍生出的中性可溶性葡聚糖刺激先天抗真菌免疫机理杀灭细菌、真菌、寄生虫、病毒以及癌症等各种病原体。中性可溶性葡聚糖作用的分子机理似乎涉及中性粒细胞和巨噬细胞这些免疫细胞细胞膜上的特异性 β -葡聚糖受体结合位点。最近的研究数据表明，C3 补体蛋白的受体 CR3 是 β -葡聚糖的主要受体。甘露多糖、半乳聚糖、含有 α (1-4) 键的葡萄糖聚合物以及含有 β (1-4) 键的葡萄糖聚合物对这一受体没有亲和力。首先，iC3b 受体 CR3 (也被称为 Mac-1、CD11b/CD18A 或 α m β 2-整联蛋白) 带有 β -葡聚糖结合凝集素位点，该位点在中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞吞噬酵母细胞壁的过程中发挥作用 (见 Ross G. D. 等人在《免疫》杂志上发表的文章，162: 2281-2290 (1999))。Mac-1/CR3 既发挥粘着分子的作用又是补体 iC3b 片段的受体，其中粘着分子在内皮中调节白血球的血球渗出过程；补体 iC3b 片段对微生物产生吞噬/脱粒反应。Mac-1/CR3 具有许多与其他整联蛋白相一致的功能特点，其中包括通过结构变化双向发送信号；这种结构变化或起源于胞浆区或起源于胞外区。Mac-1/CR3 的另一重要功能是其与固定糖基磷酸酰肌醇的受体有形成膜络合物的能力，例如有与 Fc γ RIII B(CD16b)或 Upar(CD87)形成膜络合物的能力，这一能力使这些外膜约束的受体具有穿越细胞膜的发生信号机理，这样可使受体对细胞骨架依赖性附着或吞噬作用和脱粒作用进行调节。许多功能似乎是依靠接近膜的凝集素位点，凝集素位点或者负责识别微生物表面的多糖或者负责识别与糖基磷酸酰肌醇相连的信号发生配体。由于 Mac-1/CR3 在促进中性粒细胞的炎症应答方面起着

重要的作用，所以与其功能相对抗的治疗策略在治疗自身免疫疾病和局部缺血/再灌注损伤方面很有前途。相反的是，与其凝集素位点相结合的可溶性 β -葡聚糖对循环巨噬细胞和天然杀伤细胞的 Mac-1/CR3 进行启动，从而根据 iC3b 调理的肿瘤细胞而产生细胞毒性脱粒作用，否则肿瘤细胞将避开这种细胞介导的细胞毒性机理。CR3 对可溶性真菌 β -葡聚糖具有较高的结合亲和力 ($5 \times 10^{-8} \text{M}$)，并对巨噬细胞或天然杀伤细胞进行启动，从而根据 iC3b 覆盖的肿瘤细胞产生细胞毒性脱粒作用。在缺乏血清 C3(补体 3) 或白细胞 CR3 的小鼠体内没有出现可溶性 β -葡聚糖诱导的杀灭肿瘤反应，这一点表明了肿瘤细胞上 iC3b 以及白细胞上的 CR3 对于 β -葡聚糖杀灭肿瘤细胞的重要性 (见 Vetvicka V. 等人在《临床研究》上发表的文章, 98: 50-61 (1996), 见 Yan J. V. 等人在《免疫学》上发表的文章, 163: 3045-3052 (1999))。与 β -葡聚糖受体相结合的配体可导致补体被激活，并导致吞噬作用、溶酶体酶释放以及前列腺素、促凝血素和和白细胞三烯的生成。以往技术中所述的大多数 β -葡聚糖制剂刺激细胞因子的产生，比如刺激白细胞间素-1 和肿瘤坏死因子的产生，白细胞间素-1 和肿瘤坏死因子具有抗肿瘤活性。另一方面，中性可溶性 β -葡聚糖并不刺激细胞因子的释放，最可能的原因是中性可溶性 β -葡聚糖太小以致无法与膜 CR3 形成交联。

对于葡聚糖颗粒吞噬作用所涉及的葡聚糖而言，Dectin-1 是 β -葡聚糖的第二个膜受体。Dectin-1 在巯基乙酸盐诱导的腹膜巨噬细胞上高度表达，其活性通过 β -葡聚糖与这些活化细胞的结合而主导着酵母吞噬作用中 CR3 的活性。然而，中性粒细胞和驻留型腹膜巨噬细胞所形成的酵母吞噬作用受到抗 CR3 物质的阻碍，缺乏 CR3 (CD11b^{-/-}) 的中性粒细胞或驻留型巨噬细胞没有出现酵母吞噬作用。再者，Dectin-1 不被天然杀伤细胞所表达，天然杀伤细胞在经过 β -葡聚糖启动后使用 CR3 调节对 iC3b

调理的乳腺癌细胞的杀灭活性。因此，Dectin-1 在调节 β -葡聚糖活性方面似乎受到活性腹膜巨噬细胞的限制，也许还受到肠内 CR3^{-/-}巨噬细胞的限制。

葡聚糖的来源

正如本文所用的， β -葡聚糖是指葡萄糖聚合物，这一葡萄糖聚合物由细胞壁衍生出来，并含有 β 1,3 键和 β 1,6 键。人们已经制备出了各种形式的 β -葡聚糖颗粒和可溶性 β -葡聚糖。

适用于本发明的一种具体的可溶性葡聚糖是全葡聚糖颗粒，这是一种提纯的酵母细胞壁制剂。通过去除甘露聚糖蛋白的外层，并在保持葡聚糖体内形态的同时使 β -葡聚糖曝露出来可制得全葡聚糖颗粒。在某些实施方案中，全葡聚糖颗粒的直径为 1 微米或大于 1 微米。通过使生长过程中的酵母与其生长介导分离，然后用碱对完整的酵母细胞壁进行处理，从而去除不需的蛋白质和核酸物质，这样制得的酵母细胞壁残余物便是全葡聚糖颗粒。

在某些实施方案中，本文所述方法中所用的全葡聚糖颗粒是口服生物活性成分。正如本文所使用的，“生物活性”是指全葡聚糖颗粒能够达到功效目标。换句话说就是，全葡聚糖颗粒含有足够的 β (1,3;1,6) 葡聚糖，这些葡聚糖被派伊尔淋巴集节所吸收。葡聚糖被派伊尔淋巴集节所吸收，并被巨噬细胞吞噬和降解，然后传送到骨髓中，降解的片段在骨髓中被释放出来。这些降解后的片段与骨髓中的中性粒细胞相结合，并通过趋化性而迁移到抗体覆盖的肿瘤细胞上并与肿瘤细胞相结合，其中肿瘤细胞上的补体已经通过 iC3b 在肿瘤细胞上的沉积所激活。举例而言，全葡聚糖颗粒能够到达肿瘤细胞，并同抗体一同作用于肿瘤细胞。在全葡聚糖的作用位点，葡聚糖通过与 CR3 受体的结合而刺激细胞，这反过来又启动或促进 CR3 发挥功能。通过胃肠巨噬细

胞将全葡聚糖颗粒输送到骨髓中可以介导口服全葡聚糖的生物药效率，胃肠巨噬细胞使全葡聚糖发生降解。降解后的颗粒然后在骨髓中发挥作用，当中性粒细胞迁移到肿瘤细胞上并与肿瘤细胞上的 iC3b 相结合时，这些降解的颗粒通过激活 CR3 而刺激中性粒细胞。

适用于本发明的另一葡聚糖来源是微粒型葡聚糖颗粒。在本文中，微粒型葡聚糖颗粒被定义为全葡聚糖颗粒的一部分，将酵母细胞壁 β (1-3; 1-6) 葡聚糖精细研磨到 1 微米左右或 1 微米以下便得到了微粒型葡聚糖颗粒。正如 5,702,719 号美国专利所述的，这种形式的 β -葡聚糖被用作营养补品和皮肤修复剂。适用于本文所述方法的其他葡聚糖包括 WGPTM β -葡聚糖和 β RightTM，这两种产品由明尼苏达州的生物聚合物工程公司制造。本文下面将对这些化合物的制备以及这些化合物与抗体联合使用来治疗赘生细胞进行说明。

微粒型 β -葡聚糖颗粒也具有增强使用者免疫系统的功能。见 5,223,491 号和 5,576,015 号美国专利，这两篇专利的内容在此通过引证被并入本文。

适用于本文所述方法的另一种形式的葡聚糖是中性可溶性葡聚糖。通过一系列酸、碱和中和处理步骤可生产出结构纯的中性可溶性葡聚糖制剂。中性可溶性葡聚糖制剂可增强使用者的免疫系统功能，但不会诱导白细胞间素-1 和肿瘤坏死因子的产生，因此中性可溶性葡聚糖制剂不会引起炎症。见 5,783,569 号美国专利，该专利的全文在此通过引证被并入本文。

制备全葡聚糖颗粒

简单而言，生产全葡聚糖颗粒的过程涉及不溶于碱性物质的全葡聚糖颗粒的萃取和提纯，其中的全葡聚糖颗粒由酵母细胞壁或真菌细胞壁制得。这一过程产生一种产品，这一产品保持着体内葡聚糖所具有的形态和结构特性，这一产品被称为全葡聚糖或全葡聚糖颗粒。

全葡聚糖制剂的结构-功能特性直接取决于葡聚糖的来源，同时还取决于最终产品的纯度。全葡聚糖的来源可以是酵母或其他真菌或任何其他含有葡聚糖的来源，其中的葡聚糖具有本文所述的特性，在某些实施方案中，酵母细胞是优选的葡聚糖来源。本过程所用的酵母菌株可以是任何的酵母菌株，例如包括啤酒酵母菌株、delbrueckii 菌株、rosei 菌株、微椭圆菌株、卡尔酵母菌株、二孢酵母菌株、发酵芽胞菌株、rouxii 菌株等。

一般而言，上述过程可用来将其他突变的酵母菌株与作为起始材料的其他原始菌株分离开来。此外，可采用诱变剂来诱导突变，举例而言，可使用化学诱变剂、辐射或其他脱氧核糖核酸和重组体控制手段来诱导突变。同样还可以使用其他的选择或筛分技术来制备全葡聚糖颗粒。

酵母细胞可使用本领域已知的技术加以制造。举例而言，典型的生长介质包括葡萄糖、蛋白胨以及酵母提取物。通过使用将生物物质与液体介质相分离的常规技术可以将酵母细胞与生长介质分离开，并对酵母细胞进行收集。这些方法通常使用诸如过滤或离心分离这样的固-液分离工艺。在本工艺过程中，优选的情况是在酵母细胞对数生长期的中后期对酵母细胞进行收集，从而使酵母细胞中的糖原和壳多糖含量达到最低程度。在某些实施

方案中，糖原、壳多糖和蛋白质是不良污染物，这些不良污染物会对全葡聚糖颗粒的生物学特性和流体力学特性造成不利影响。在其他实施方案中，制剂中葡聚糖的含量大于 50%。在某些实施方案中，其余部分由细胞内脂质和/或糖原组成。

制备全葡聚糖颗粒包括使用适当浓度的碱性水溶液对酵母进行处理，从而将一部分酵母溶解掉，并由此生成不溶于碱性氢氧化物的全葡聚糖颗粒，这些全葡聚糖颗粒主要含有 β (1-6) 键和 β (1-3) 键。在制备全葡聚糖颗粒过程中所使用的碱性物质通常为碱金属氢氧化物，比如氢氧化钠或氢氧化钾等。制备全葡聚糖所用的原料是从生长介质中分离出来的酵母。在酵母原料浓度较低的情况下，将氢氧化物溶液的消耗量和浓度控制在理想的范围内是十分困难的。酵母应该带有完整的未出现破裂的细胞壁，因为本发明中全葡聚糖颗粒的性质是否理想取决于细胞壁是否完整。

酵母在氢氧化物水溶液中进行处理，酵母细胞的细胞内组分和甘露糖蛋白溶解于氢氧化物水溶液中，剩余的不溶性细胞壁物质基本上不含蛋白质，并含有基本上未发生改变的三维 β (1-6) 键和 β (1-3) 键矩阵的葡聚糖。在优选的操作条件下，细胞壁中的甘露聚糖成分在这一处理步骤中溶解于氢氧化物水溶液中。细胞内的组分发生水解并进入到溶解相中。对酵母进行处理的条件至少要使细胞的主要组分和细胞壁的三维结构不被破坏。在特定环境下，基本上所有的细胞壁葡聚糖未发生改变。

在某些实施方案中，使用氢氧化物水溶液对酵母进行浸泡的过程是在氢氧化物溶液的初始当量浓度约在 0.1~10.0 的情况下进行的。典型的氢氧化物溶液含有元素周期表中碱金属族的氢氧化物和碱土金属的氢氧化物。由于比较容易得到，所以优选的氢氧化物水溶液是氢氧化钠水溶液和氢氧化钾水溶液。浸泡过程约

在 20℃~121℃ 的条件下进行，浸泡的温度越低浸泡的时间越长。当使用氢氧化钠水溶液时，浸泡的温度约在 80℃~100℃ 之间，溶液的初始当量浓度约在 0.75~1.5 之间。所加入的氢氧化物是过量的，因此不必再添加氢氧化物。

在一般情况下，每升氢氧化物溶液所处理的干酵母数量约在 10~500 克之间。在某些实施方案中。使用氢氧化物水溶液浸泡酵母的过程是由一系列接触步骤实现的。在这种情况下，诸如蛋白质这些杂质的残余量要少于只使用一次浸泡的杂质残余量。在某些实施方案中，应该基本上将所有的蛋白质从细胞中除去。蛋白质的脱除程度应该使蛋白质在不溶性细胞壁葡聚糖颗粒中的残余量低于 1%。在优选条件下，还应在 pH 值约在 2.0~6.0 之间的酸性溶液中进行萃取处理。典型的酸性溶液包括盐酸、使用盐酸和醋酸盐缓冲物调制到所需 PH 值的氯化钠溶液。其他常用的酸性溶液包括硫酸溶液和含有适当缓冲剂的乙酸溶液。在优选条件下，萃取过程在约 20℃~100℃ 下进行。如果需要，经过浸泡的葡聚糖颗粒可以再进行洗涤和萃取处理。从而减少蛋白质和杂质的含量。在经过处理后，可将产物的 pH 值调节到约 6.0~7.8 之间。

在完成了这一不会对细胞壁造成破坏的处理步骤后，萃取过程可以在更严格的 pH 值和温度条件下进行，而以往的处理过程会对细胞壁造成损坏。本发明中的处理过程在采用这些严格的萃取条件时避免了产品的质量出现下降，本发明中的萃取过程消除了十分耗时的多级萃取步骤。

在经过上述氢氧化物溶液处理后，全葡聚糖最终产物的重量约为酵母原料重量的 5~30%，在优选情况下，最终产物的重约为原料重量的 7~15%。

不溶于氢氧化物溶液的全葡聚糖颗粒将在发明概述中进行说明。如果需要,全葡聚糖颗粒还可进行进一步的处理和/或提纯。举例而言,葡聚糖可干燥成细小的粉末(即在干燥炉中进行干燥),或者使用有机溶剂(比如乙醇、醚类物质、丙酮、甲乙酮、氯仿)进行处理,从而除去微量杂质或溶于有机溶剂的物质;或者再用氢氧化物溶液进行处理,从而除去可能存在的其他蛋白质或其他杂质。

在某些实施方案中,本发明工艺过程所生产出的全葡聚糖颗粒由纯葡聚糖构成,其中的葡聚糖基本是 β (1-6)和 β (1-3)键葡聚糖。全葡聚糖颗粒含有极少的蛋白质的糖原杂质。在某些实施方案中,全葡聚糖颗粒的形状为球形,直径约在2~10微米之间,当使用单糖分析或其他适当的分析时,全葡聚糖所含己糖的重量比约大于85%(在其他实施方案中己糖的重量比大于约60%),蛋白质的重量比约为1%,可检测到的甘露聚糖的含量小于1%。使用以往技术所制得的葡聚糖所含壳多糖和糖原的数量大大高于本发明中的葡聚糖。

正如本文前面所述,第二步是采用化学处理手段对全葡聚糖颗粒进行改性,从而改变葡聚糖的特性。除了从本文所述的那些具体酵母菌株所衍生出的全葡聚糖颗粒外,由任何酵母菌株所衍生出的全葡聚糖颗粒均可以使用。正如前面所述的,可以使用的酵母种类很多。前面所述的处理条件同样适用于从真菌中提取葡聚糖的过程。同样,这些葡聚糖的特性也取决于它们的来源。

在第一步化学处理中,可使用酸类物质对全葡聚糖颗粒进行处理,从而减少 β (1-6)键的数量,并由此改变所述葡聚糖的流体力学性质,其表现结果是改性后葡聚糖水溶液的粘度会增加。

还可以使用酸性物类在适当的时间内对全葡聚糖颗粒进行处理，从而改变 β （1-6）键。乙酸由于其酸度适中、使用简便、毒性低、成本低及容易获得而是一种理想的酸性材料，但其他种类的酸也可以使用。一般而言，这些酸的酸度要适中，其酸度应足以限制 β （1-3）键发生水解。对全葡聚糖颗粒进行改性处理是在一定条件下进行的，这些条件基本上只对含 β （1-6）键的葡聚糖发生影响。在某些实施方案中，酸处理过程是使用基本上由乙酸组成的溶液或本文所述的稀释液（常用的稀释液可以是有机溶剂或有机酸溶液）进行的。处理过程的温度约在 20°C ~ 100°C 之间。在某些实施方案中，酸处理过程可将处理前全葡聚糖颗粒中重量约为3~20%左右的酸溶性物质除去。在其他的实施方案中，所脱除的重量比约为3~4%。经过酸处理后所形成的某些组分能够表明全葡聚糖颗粒的流体力学性质已发生变化，并且表明处理后的粘度有所增加。

在第二步化学处理中，使用酶或酸对全葡聚糖颗粒进行处理，从而改变 β （1-3）键的数量。对于由某些酵母菌株衍生出的全葡聚糖颗粒而言，使用酶对其进行处理会使其粘度降低，但对于其他由酵母衍生出的全葡聚糖颗粒而言，酶处理过程会使这些全葡聚糖颗粒的粘度上升。但一般而言，酶处理过程会改变葡聚糖的化学性质和流体力学性质。酶处理过程是使用 β （1-3）葡聚糖酶对全葡聚糖颗粒进行处理，例如使用昆布糖酶对全葡聚糖颗粒进行处理，从而改变 β （1-3）键，并由此改变全葡聚糖水合悬浮液的流体力学性质。

酶处理过程可在全葡聚糖的水溶液中进行，其中葡聚糖的浓度约在0.1~10.0克/升之间。任何可水解的葡聚糖酶都可以使用，比如可使用昆布糖酶，这种糖酶十分有效并且十分容易获得。培养期可视全葡聚糖颗粒和全葡聚糖酶的浓度而变化。在诸如乙酸

这样具有中等酸度的环境下， β （1-3）键具有抗水解能力。当使用强酸或浓酸进行处理时，比如使用盐酸、硫酸或甲酸进行处理时， β （1-3）键会发生水解，从而减少 β （1-3）键的数量。酸处理过程可在全葡聚糖的水溶液中进行，其中葡聚糖的浓度约在0.1~10.0克/升之间。酸处理的时间可视全葡聚糖颗粒的浓度和酸的浓度而变化。酸处理过程可在20℃~100℃左右的温度下进行。在优选条件下，酸处理过程后所形成的组分可表明流体力学性质的变化。

通过控制培养时间可以控制所生成产物的化学性质和流体力学性质。举例而言，可以对产物的粘度进行精确的控制，从而使产物用于特定的用途，比如用于各种食品中。

最终产物的流体力学参数（ K_1 ）取决于处理时间的长短，该参数由以下公式计算：

$$K_1 = -0.0021 \text{（时间）} + 0.26$$

其中时间的单位为分钟并且不到1小时。

参数 K_1 直接与产物的相对粘度相关（成比例）。在产物的水合悬浮液中，如果以厘泊为单位进行计量时，相对粘度与实际粘度相等。

本发明提供制备葡聚糖水合浆液的工艺方法，该水合浆液具有所需的预定粘度。该浆液所含葡聚糖的浓度是所需预定粘度的函数，所需预定粘度由以下近似公式计算：

$$1/\text{浓度} = K_1 \times (1/\log(\text{相对粘度})) + K_2$$

其中 $K_1 = (\text{形状因子}) \times (\text{流体力学体积})$, $K_2 = (\text{流体力学体积}) / (\text{最大充填率})$ 。

形状因子是经验值, 该经验值表明了在水合环境中的葡聚糖矩阵的形状。形状因子是葡聚糖颗粒长、宽比的函数, 形状因子可通过显微观察的方式加以确定。流体力学体积是葡聚糖颗粒在悬浮液中所占的体积。流体力学体积是葡聚糖悬浮液的一项重要参数, 该参数表明了葡聚糖矩阵的含水能力的高低。最大充填率可以被描述成在单位体积的悬浮液中能够获得的最大葡聚糖体积分率。

制备微粒型 β -葡聚糖颗粒

通过本领域普通技术人员所知的传统方法可从酵母细胞壁中分离出 $\beta(1,3)$ 葡聚糖的原料。从酵母制备葡聚糖的常用方法包括碱萃取过程以及其后的酸萃取过程(见 Hassid 等人在《美国化学协会杂志》上发表的文章, 63: 295-298, 1941)。5,223,491 号美国专利对分离高纯 $\beta(1,3)$ 葡聚糖萃取物的改进方法进行了说明, 其中的 $\beta(1,3)$ 葡聚糖不溶于水, 该专利在此通过引证被并入本文。5,702,719 号美国专利对制备微粒型 β -葡聚糖的方法进行了说明, 该专利的全文在此通过引证被并入本文。所制得的葡聚糖微粒的平均颗粒直径约为 1.0 微米或 1.0 微米之下, 或者平均颗粒直径约为 0.2 微米或 0.2 微米之下。

通过机械方式可以降低 β -葡聚糖颗粒的直径, 例如可采用捣碎机、微流化器或球磨机来减小 β -葡聚糖颗粒的大小。举例而言, 可使用带有钝刀片的捣碎机来降低葡聚糖颗粒的大小, 其中葡聚糖混合物在足够长的时间内被捣碎, 从而在不导致混合物出现过热的情况下将颗粒研磨到所需的大小, 优选的研磨时间为几分钟。另外一种研磨方式是使用 10 毫米不锈钢球研磨机对葡聚

糖颗粒进行研磨。当希望制备 0.2 微米或更小的葡聚糖颗粒时，后一种研磨方式特别适用。

在进行研磨之前，葡聚糖混合物最好经过一系列的筛分，其中每个筛网的目数都大于前一个筛网的目数，最后一个筛网的目数约为 80。对葡聚糖混合物进行筛分的目的在于将更大更粗的葡聚糖颗粒与更小的颗粒分离开（80 目筛网的孔径约为 0.007 英寸或 0.178 毫米）。分离出的较大颗粒然后按前面所述的研磨方法再进行研磨，并使用最后一个筛网为 80 目的筛分机再次进行筛分。筛分过程和研磨过程可重复进行，直至最终得到的颗粒可穿过 80 目的筛网。筛分出的颗粒被混合到一起，并进行进一步的研磨，优选的研磨时间至少为 1 小时，直至达到所需的颗粒大小，优选的颗粒直径约为 1.0 微米或更小，更理想的颗粒直径约为 0.2 微米或更小。在研磨过程中对葡聚糖颗粒进行定期的采样，并用显微镜上的测微计测定颗粒的大小。

可溶性葡聚糖

此外，经过加工的 β (1,3; 1,6) 葡聚糖更多的是中性可溶性 β -葡聚糖。一般而言，中性非衍生 β (1,3; 1,6) 葡聚糖由于具有形成紧密结合的三链螺旋结构原纤维的能力，所以不溶于生理介质中，其中的三链螺旋结构原纤维具有抗水合作用。通过一系列的酸处理、碱处理以及中和处理过程可以从全葡聚糖颗粒制备中性可溶性 β -葡聚糖，通过这些处理步骤可产生可溶性的结构纯葡聚糖制品，该制品可保存在清洗的溶液中。制备可溶性葡聚糖的方法在本领域是已知的，5,322,841 号美国专利对制备可溶性葡聚糖的方法进行了说明，该专利在此通过引证被并入本文。这一工艺方法所制备出的可溶性葡聚糖是具有分支结构的葡萄糖聚合物，该聚合物含有 β (1,3) 键和 β (1,6) 键，其中 β (1,3) 键与 β (1,6) 键的比例取决于原微生物和所使用的具体处理条件。

可溶性葡聚糖的平均分子量约为 5,000~500,000 道尔顿。可溶性葡聚糖以多种方式增强其使用者的免疫系统功能。然而可溶性葡聚糖并不刺激诸如白细胞间素-1 和肿瘤坏死因子这些细胞因子的产生，因此可溶性葡聚糖不会引发炎症。有关这方面的内容见 5,783,569 号美国专利，该专利在此通过引证被并入本文。WGP 还可分解成多种组分，每种组分与先天免疫细胞上亚型受体的亲和力和是不同的。这些不同的结构形式在复杂性、随机螺旋、单螺旋、三链螺旋和三链螺旋多体上是递增的。在某些实施方案中，三链螺旋结构的分子量约为 150,000。可溶性葡聚糖中分子量更高的构象异构体并不与 CR3 结合，但可以被吞噬和降解成更小的片段，这些更小的片段能够与 CR3 相结合。WGP 具有多种生物活性，WGP 可用作疫苗辅剂（见 5,741,495 号美国专利）、抗感染剂和抗肿瘤剂。每种结构形式具有不同的活性，这些不同的活性由葡聚糖受体的不同特性表现出来。

制备中性可溶性葡聚糖

5,322,841 号美国专利对制备可溶性葡聚糖进行了说明，该专利的内容在此通过引证被并入本文。简单而言，这一方法包括对 WGP 进行一系列的酸、碱处理，从而产生可溶性葡聚糖，可溶性葡聚糖形成具有中性 pH 值的清洁溶液。本发明中所用的 WGP 可以以干燥粉末的形式存在，干燥粉末由本文前面所述的工艺过程加以制备。就本发明而言，没有必要进行最后的有机萃取和洗涤步骤。

在本工艺过程中，WGP 悬浮于酸性溶液中，WGP 所处的条件足以溶解可溶于酸性溶液中的葡聚糖部分。对大多数葡聚糖而言，当酸性溶液的 pH 值约在 1~5 之间，温度约在 20℃~100℃之间时，该酸性溶液便足以溶解 WGP 中可溶于酸性溶液的部分。在优选情况下，所使用的酸是有机酸，该有机酸能够溶解可溶于

酸性物质的葡聚糖部分。浓度约为 0.1~5m 的乙酸和浓度约为 50%~98%（重量/体积）的甲酸可以使用。此外，还可以使用硫酸。在优选情况下，处理过程是在 90℃ 下进行的。处理时间可在 1~20 小时左右，处理时间的长短取决于酸的浓度、温度以及 WGP 的来源。举例而言，经过改性的葡聚糖比自然存在的葡聚糖和野生型葡聚糖带有更多的 β （1-6）支链，而且经过改性的葡聚糖需要更苛刻的条件，即处理的时间更长、温度更高。这一酸处理步骤可在相似条件或不同条件下重复进行。在本方法的某一实施方案中，所使用的改性 WGP 是由 *S.cerevisiae* R4 菌株衍生出来的，这一改性的 WGP 比自然存在的葡聚糖具有更多的 β （1-6）支链，处理过程进行两次，第一次是在 0.5M 乙酸及 90℃ 下进行的，第一次处理过程的持续时间为 3 小时；第二次处理过程是在 0.5M 乙酸及 90℃ 下进行的，第二次处理过程的持续时间为 20 小时。

然后通过适当的分离技术，例如通过离心分离或过滤技术将不溶于酸性物质的葡聚糖颗粒从溶液中分离出来。然后通过使用诸如氢氧化钠这样的碱性化合物将制得的浆液的 pH 值调节到 7~14 左右。然后再使浆液悬浮于热碱中，其中热碱的浓度和温度足以溶解葡聚糖。这一步骤中所用的碱性化合物包括碱金属氢氧化物或碱土金属氢氧化物，比如氢氧化钠或氢氧化钾，氢氧化物的浓度约在 0.1~10N 之间。这一步骤可在 4℃~121℃ 左右进行，优选的温度约在 20℃~100℃ 之间。在某一实施方案中，所使用的碱性物质是浓度为 1N 的氢氧化钠溶液，其温度约在 80℃~100℃ 之间，处理时间约在 1~2 小时。所得到的混合物含有可溶性葡聚糖分子和残留的葡聚糖颗粒，由于蛋白质杂质的氧化以及糖分的存在，所得到的混合物为深褐色。通过适当的分离技术将颗粒残留物从混合物中除去，例如通过离心分离技术和/或过滤技术将颗粒残留物从混合物中除去。

所得到的溶液含有可溶性葡聚糖分子。可以选择的是，可以对该溶液进行浓缩，使其可溶性、葡聚糖渗余物浓度达到 5~10 倍，从而使可溶性葡聚糖的浓度约在 1~5 毫克/毫升。这一步骤可通过适当的浓缩技术完成，比如使用额定分子量约在 1,000~100,000 道尔顿的膜进行超滤过程来对溶液进行浓缩。分子量约为 10,000 的膜尤其适用于这一步骤。

经过该处理步骤的浓缩部分富含可溶性的且具有生物活性的葡聚糖，也被称为 PGG。为了得到药理上可接受的溶液，葡聚糖浓缩物可进行进一步的提纯，比如通过渗滤过程进行提纯。在某一实施方案中，渗滤过程是在使用约 10 个体积的碱性物质的条件下进行的，其中碱性物质的浓度约在 0.2~0.4N。在优选情况下，经过这一步骤后可溶性葡聚糖的浓度约在 2~5 毫克/毫升。然后使用酸性物质将溶液的 pH 值调至 7~9 左右，比如使用盐酸来调节溶液的 pH 值。通过使溶液与诸如二乙氨基乙基纤维素、季铵基乙基纤维素或 Q-琼脂糖这样的带正电荷的介质相接触可以除去溶液中可能存在的微量蛋白质类物质。蛋白质类物质对于葡聚糖产品的质量是有害的，它可导致溶液出现脱色，并促进胶体网络的形成，从而限制中性葡聚糖的溶解度。在这一步骤后可获得清洁的溶液。

高纯、清洁的葡聚糖溶液可以进行进一步的提纯，比如使用药理上可接受的介质（比如注射用无菌水、磷酸盐缓冲盐水、等张盐水、右旋糖）进行渗滤过程而对葡聚糖溶液进行提纯。在优选情况下，渗滤过程所用的膜的额定分子量约为 10,000 道尔顿。葡聚糖溶液的最终浓度被调节在 0.5~5 毫克/毫升左右。根据制药标准，该溶液通过 0.22 微米过滤器进行过滤而实现最终消毒。该过程制备出的可溶性葡聚糖制剂是无菌的、不含抗原的且基本上

没有热原性物质，该制剂可在室温下长期保存而不会出现质量下降。

激活补体的抗体

能够激活补体的抗体（包括自然存在的抗体和本领域已知方法所制备出的抗体）是作用于肿瘤或肿瘤抗原的抗体，这些抗体可以激活补体群落中的一个或多个补体成员。换句话说就是需要一种能够充分激活补体并使 iC3b 沉积在肿瘤细胞上的抗体。在某些实施方案中，抗体是 I 亚型免疫球蛋白 G 或 III 亚型免疫球蛋白 G。

本发明还对可溶性葡聚糖与抗体的使用进行了说明，其中可溶性葡聚糖基本上可由任何来源产生，抗体包括感染所引发的自然抗体、疫苗所引发的抗体以及直接使用的单克隆抗体；其中单克隆抗体是疗法的一个组成部分，该疗法包括使用 β -葡聚糖。任何具有激活补体特性的抗体都可被本文所述的方法用来增强 β -葡聚糖的杀灭肿瘤活性。使用本领域已知的技术可对鼠性抗体进行升级，使用其能够抵抗与赘生（肿瘤）细胞相关的抗原。在这一方面，肿瘤细胞表达着数量较多的各种各样的分子受体，这些分子能够提高自身的增殖，其中许多分子是致癌基因的产物。因此，人们已制备出了许多单克隆抗体，这些单克隆抗体可以抵抗诸如移动蛋白、白细胞间素-2 以及表皮生长因子这些蛋白的受体。任何有选择性地对抗原进行跟踪并能激活补体的抗体在与 β -葡聚糖共同使用时都能使自身的活性得到增强。这些抗体包括各种类型的抗体，比如免疫球蛋白 A、免疫球蛋白 D、免疫球蛋白 E 和免疫球蛋白 M，还包括诸如 Fab 这样的抗体片段。

正如本文所用的，“抗体”是指免疫球蛋白分子以及免疫球蛋白分子中具有免疫活性的部分，比如含有抗原结合位点的分子

中具有免疫活性的部分，其中的抗原结合位点专门与肿瘤抗原相结合。专门与肿瘤相结合的分子是与肿瘤多肽或肿瘤片段相结合的分子，但基本上不与生物试样中的其他分子相结合，其中生物试样中含有天然多肽类物质。免疫球蛋白分子中具有免疫活性的部分包括 $F(ab)$ 和 $F(ab')_2$ 片段，使用诸如胃蛋白酶这样的酶对抗体进行处理可产生 $F(ab)$ 和 $F(ab')_2$ 片段。正如本文所使用的，“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指抗体分子群落，这些抗体分子只含有一种抗原结合位点，该抗原结合位点能够与肿瘤靶目标的某一特定表位发生免疫反应。因此，单克隆抗体组合物通常对本发明中的特定多肽类物质具有单一的结合亲和力，单克隆抗体组合物与特定的多肽类物质发生免疫反应。

按照本文前面所述，通过对适当的个体使用所需的免疫源进行免疫接种可以制备出多克隆抗体，比如使用本发明中的多肽类物质或多肽类物质的片段作为免疫源。抗体在一段时期内在免疫个体中的效价可采用标准技术进行测定，比如使用酶联免疫吸附测定法对抗体的效价进行测定。如果需要，作用于多肽类物质的抗体分子可以从哺乳动物体内分离出来（比如从血液中分离出来）并采用已知的技术进行进一步的提纯，比如使用蛋白 A 色谱仪进行提纯，从而得到免疫球蛋白 G。在实施免疫接种后的适当时间，即抗体效价处于最高时，可从个体获得产生抗体的细胞，并使用标准技术从这些细胞制备单克隆抗体，其中的标准技术包括杂交瘤技术、人类 B 细胞杂交瘤技术（Kozbor 等人在《当代免疫学》上发表的文章，4: 72）、EB 病毒-杂交瘤技术（Cole 等人所著《单克隆抗体和癌症疗法》（1985），77-96 页）或三源杂交瘤技术。（见 Kohler 和 Milstein 在《自然》上发表的文章，256: 495-497）。产生杂交瘤的技术在本领域是众所周知的技术（见 Coligan 等人编辑的《当代免疫学规程》）。简单而言，无限增殖

细胞系（通常是骨髓瘤细胞）与上述接受过免疫接种的哺乳动物的淋巴细胞（通常是脾细胞）相融合，对得到的杂交瘤细胞中的上层培养物进行筛分，从而识别能够产生与本发明中多肽类物质相结合的单克隆抗体的杂交瘤。

为了制备能与本发明中多肽类物质相结合的单克隆抗体，可以使用多种众所周知的方法使淋巴细胞与无限增殖细胞系相融合（见《当代免疫学规程》、Galfre 等人在《自然》是发表的文章，1977,266:55052、R. H. Kenneth 所著的《单克隆抗体：生物分析中的新课题》，Plenum 出版公司，纽约（1980）、Lerner 在《耶鲁生物医药杂志》上发表的文章，54: 387-402）。此外，本领域的普通技术人员将会理解，对这些方法可以进行各种各样的修改，修改后的方法同样可以使用。

除了制备可分泌单克隆抗体的杂交瘤这种途径外，能与本发明中肽类物质相结合的单克隆抗体可通过使用多肽类物质对重组体组合免疫球蛋白文库（比如抗体噬菌体展示文库）进行筛选被识别和分离出来，通过这一筛选过程可将能与多肽类物质相结合的免疫球蛋白库成员分离出来。通过商业渠道可购得生成和筛选噬菌体展示文库所用的器具（比如药用重组体噬菌体抗体系统，目录号：27-9400-01；Stratagene SurfZAPTM 噬菌体展示器具，目录号：240612）。此外，在以下文献可以找到特别适用于产生和筛选抗体展示文库所用的方法和试剂：5,223,409 号美国专利、WO92/18619 号 PCT 出版物、WO91/17271 号 PCT 出版物、WO92/20791 号 PCT 出版物、WO92/15679 号 PCT 出版物、WO93/01288 号 PCT 出版物、WO92/01047 号 PCT 出版物、WO92/09690 号 PCT 出版物、WO92/02809 号 PCT 出版物、Fuchs 等人在《生物技术》上发表的文章，9: 1370-1372、Hay 等人所著的《人类抗体杂交瘤》，3: 81-85、Huse 等人在《科学》上发

表的文章，246: 1275-1281、Griffiths 等人在《欧洲分子生物学组织杂志》上发表的文章，12: 725-734。

此外，重组体抗体，例如嵌合抗体和人源化单克隆抗体既含有人源部分也含有非人源部分，使用标准的重组体 DNA 技术可制造出重组体抗体，重组体抗体在本发明的范围之内。使用本领域所知的重组体 DNA 技术可制备出嵌合抗体和人源化单克隆抗体。

为了表明本发明的概念，诸如可溶性葡聚糖这样的 β -葡聚糖可以与 HerceptinTM 共同使用，从而达到协同疗效；HerceptinTM 是 Genentech 公司出售的一种单克隆抗体，该抗体用来治疗乳房癌。HerceptinTM 是一种能够识别 her2 细胞表面抗原的单克隆抗体，在乳房癌细胞类型中有 20% 存在 her2 细胞表面抗原。临床试验表明，HerceptinTM 可以挽救生命，但同 β -葡聚糖共同使用可以显著增强其疗效。在治疗过程中共同使用可溶性葡聚糖和 HerceptinTM 可以使对 HerceptinTM 疗法有响应的妇女人数显著增加，并使这些妇女的乳房癌得到长期持续的缓解。目前，在接受 HerceptinTM 疗法的妇女中只有 15% 表现出了长期持续的缓解。

β -葡聚糖可增强其活性的另一种单克隆抗体是美罗华，该单克隆抗体被用来治疗某一类型的非何杰氏淋巴瘤，这是一种免疫系统癌症。美罗华可有效在治疗患有轻度 B 细胞非何杰氏淋巴瘤的患者，这类患者对标准的治疗方法没有反应。B 细胞非何杰氏淋巴瘤的破坏目标是已经发生变换的白细胞（B 细胞），从而导致癌症的生长。美罗华是经过基因改造的鼠源性抗体，该抗体既含有人源性组分又含有鼠源性组分，在对 166 名患有早期轻度或生长缓慢的非何杰氏淋巴瘤患者的临床研究中，接受美罗华治疗的患者中有 48% 患者的肿瘤至少减退了一半，另有 6% 患者的肿

瘤完全消退了。 β -葡聚糖被认为可以明显增强这一疗法的疗效， β -葡聚糖可以促进抗体标记的肿瘤细胞的灭亡。

剂型及使用

可溶性葡聚糖和激活补体的抗体可顺序给药、同时给药或分次给药。此外，给药的次序可以互换，抗体可以是自然存在的抗体。

适用于本发明的口服剂型包括胶囊、凝胶剂、扁胶囊、片剂、泡腾粉剂、泡腾片剂、非泡腾粉剂、非泡腾片剂、粉剂或颗粒剂、水合溶液、水合悬浮液、非水合溶液、非水合悬浮液、水包油乳液或油包水乳液。本发明中的化合物还可以以大丸剂、药糖剂或膏剂形式存在。

一般而言，这些剂型是通过活性成分与液相载体或细微的固相载体或同时与固、液相载体均匀混合后再进行必要的成形加工而制得的。药物载体是根据所选的给药途径和标准制药方法而选定的。每种载体在与制剂中其他成分相兼容的方面上必须是“可接受的”，而且载体绝对不能对个体造成伤害。载体可以是固相载体或液相载体，具体的载体类型一般根据所选用的给药类型而定。具体适用的固相载体包括乳糖、蔗糖、凝胶、琼脂和整装粉剂。具体适用的液相载体包括水、药理上可接受的脂肪和油类物质、醇类物质或其他有机溶剂、其中包括酯类物质、乳液、糖浆或酏剂、悬浮液、溶液和/或悬浮液、由非泡腾颗粒再造的溶液和/或悬浮液以及由泡腾颗粒再造的泡腾制剂。这些液相载体可含有适用的溶剂、防腐剂、乳化剂、悬浮剂、稀释剂、甜味剂、增稠剂和熔化剂。优选的载体为食用油，比如玉米或芸苔油。聚乙烯醇也是比较理想的载体。

口服给药所用的剂型可含有无毒的、药理上可接受的惰性载体，比如乳糖、淀粉、蔗糖、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、磷酸二钙、硫酸钙、甘露醇、山梨醇、环糊精、环糊精衍生物等。

胶囊和片剂易于制造并易于吞咽或咀嚼。片剂可含有适当的载体、粘合剂、润滑剂、稀释剂、崩解剂、着色剂、调味剂、引流或熔化剂。片剂可通过压制或模制而制成，可以选择的是，片剂可与一种或多种辅剂制在一起。压制的片剂可通过将自由流体形式（比如粉末、颗粒）的活性成分挤压成形而制得。可以选择的是，自由流动形式的活性成分可以与粘合剂（比如凝胶、羟丙基甲基纤维素）、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂（比如淀粉羟乙酸钠、交联羧甲基纤维素）、表面活性剂或分散剂混合在一起。适用的粘合剂包括淀粉、凝胶、诸如葡萄糖或 β -乳糖这样的天然糖类物质、玉米甜味剂、诸如阿拉伯胶、西黄芪树胶或海藻酸钠这样的天然胶质和合成胶质、羧甲基纤维素、聚乙烯醇、蜡质物质等。可以用于片剂的润滑剂包括油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、醋酸钠、氯化钠等。崩解剂包括淀粉、甲基纤维素、琼脂、膨润土、黄胞胶等。模压成形的片剂可通过在适当的机械中将惰性稀释液湿润的活性成分粉末压模成形而制得。

可以选择的是，片剂还可以加上包衣和标记，并可以制成缓慢释放活性成分的剂型或受控释放活性成分的剂型。此外，还可以在片剂上加上肠溶包衣，从而在胃部以外的消化道中释放药物成分。

药理上可接受的具体载体和制备本发明中口服剂型所用的赋形剂在 3,903,297 号美国专利中有所说明，该专利于 1975 年 9 月 2 日被授予 Robert，该专利在此通过引证被并入本文。下列文献对制造本发明药剂所用的技术和材料进行了说明：《7

Modem Pharmaceutics》的第 9、10 章（Banker 和 Rhodes 编辑，1979）、Lieberman 等人所著的《药剂形式：片剂》（1981）以及 Ansel 所著的《药剂形式导论》（第 2 版，1976）。

适合全身给药的剂型包括水合剂型和非水合剂型，这些剂型与给药对象的血液具有相同的张力，适合全身给药的剂型还包括水合无菌悬浮液和非水合无菌悬浮液，这些悬浮液包括的悬浮系统可使悬浮液中的化合物以血液成分为目标或以一个或多个器官为目标。这些制剂可存放在单剂量或多剂量密封容器中，比如存放于安瓿瓶或玻璃瓶中。从无菌粉末、颗粒以及前面所述的片剂可以制备出现用的注射溶液和悬浮液。全身给药剂型和静脉注射剂还可以包括矿物质和其他物质，从而使这些剂型与注射类型或所选的释药系统相适应。

本文所引述的所有文献在些通过引证被并入本文。现在将通过下面的实例对本发明进行说明，这些实例并不对本发明构成任何限制。

实例

CR3 在 β -葡聚糖的抗肿瘤活性中发挥着非常重要的作用。通过对 iC3b 调理过的酵母的中性粒细胞吞噬作用机理进行研究，人们已经发现 CR3 的作用在于介导对 β -葡聚糖的反应。当 iC3b 附着在某一表面上时，它可以被血清蛋白剪切下来，从而形成更小的 iC3b 片段。当 iC3b 处于“失活”状态时，iC3b 不能形成攻击膜的络合物，但 iC3b 仍然附着在表面上，此时 iC3b 的作用是吸引中性粒细胞和巨噬细胞，这两种细胞可以吞噬可破坏被标记（“调理过的”）细胞。在中性粒细胞和巨噬细胞的表面存在着补体受体（CR3），该补体受体与 iC3b 相结合。图 1 表明了酵母被免疫系统消灭的过程。

刺激 CR3 依赖性吞噬作用或脱粒作用需要 CR3 内两个不同的位点同时发生连接作用；一个位点专门与 iC3b 相连，另一个位点专门与酵母细胞壁的 β -葡聚糖相连。正如图 2 所示的，由于酵母在细胞表面上缺乏能与 CR3 相结合的 β -葡聚糖，所以经过 iC3b 调理过的酵母菌通过 CR3 与中性粒细胞相结合，但不会刺激吞噬作用或脱粒作用。然而，正如图 3 所示的，所加入的 β -葡聚糖可以与 CR3 的凝集素位点相结合，从而激活带有受体的免疫细胞，并由此触发外源性物质的脱粒作用或吞噬作用。甘露聚糖中富含可溶性的由酵母多聚衍生出的多糖， β -葡聚糖与 CR3 具有较高的亲和力， β -葡聚糖诱导受体的启动。

图 4 表明的是在 iC3b 调理过的乳房癌细胞触发细胞毒性过程中 β -葡聚糖对鼠源性中性粒细胞 CR3 的诱导作用。当使用正常的中性粒细胞时，加入 β -葡聚糖会产生针对 iC3b 调理过的乳房肿瘤细胞较高的细胞毒性。然而，当加入 CD11b（鼠源性 CR3 的等效物）的抗体时，受体与 iC3b 相结合的能力受到了干扰，所以这种细胞毒性便消失了。在图 4 右侧表明的是，即使当使用 β -葡聚糖进行刺激时，缺乏 CD-11b 小鼠的中性粒细胞也不能介导 iC3b 调理过小鼠的细胞毒性，这再次表明了该受体的重要性。正如所预料的，加入抗 CD11b 抗体对缺乏 CD11b 的中性粒细胞几乎没有影响。

图 5 表明的是肿瘤细胞被免疫球蛋白 G、免疫球蛋白 M 和 C3 所包裹。这一点十分有意义，因为它表明适应性免疫系统对这些肿瘤细胞出现了微弱的反应，并且当这种现象可用来触发细胞毒性反应时，肿瘤的生长可得到抑制或消除。流式细胞仪被用来区分乳房肿瘤细胞和正常的乳房表皮细胞，并表明大多数肿瘤细胞带有免疫球蛋白 G、免疫球蛋白 M 和 C3。研究人员对取自两个患者的新鲜肿瘤的单细胞悬浮液进行了分析。图 5 表明的是

从一位患者身上取下的肿瘤所得到的结果。通过使用生物素化抗粘蛋白-维生素 H 单克隆抗体 BrE-3 进行染色来区分恶性细胞和正常的乳房表皮细胞。通过使用与异硫氰酸荧光素相连的抗体进行双重染色来确定 MUC1 呈阳性的恶性细胞上存在免疫球蛋白 G、免疫球蛋白 M 和 C3。正如可以看到的，大多数 MUC1 阳性细胞带有免疫球蛋白 G、免疫球蛋白 M 和 C3。只有很少部分 MUC1 阳性细胞没有发生 C3 调理作用。在 MUC1 阴性细胞上几乎没有出现 C3 或免疫球蛋白染色，这代表着正常乳房表皮细胞。

在本发明中，不同形式的 β -葡聚糖对免疫系统具有不同的协同效应。免疫细胞通过 CR3 对可溶性 β -葡聚糖和颗粒型 β -葡聚糖作出响应。然而，对于这两种不同形式的 β -葡聚糖而言，这种响应也是不同的。CR3 在中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜曙红细胞、天然杀伤细胞、树突细胞和某些 T 细胞中表达。可溶性 β -葡聚糖（比如可溶性葡聚糖）与 CR3 相结合并按某种方式启动 iC3b 受体，在这种方式下， β -葡聚糖能够启动白细胞来杀灭肿瘤细胞或被 CR3 靶配体 iC3b 所包围的微生物。另一方面，颗粒型 β -葡聚糖（比如全葡聚糖颗粒）也可与 CR3 相结合，刺激中性细胞的脱粒作用并刺激巨噬细胞分泌几种细胞因子，这些细胞因子会促进 Th1 型 T 细胞反应并促进对肿瘤或微生物的长期免疫力。颗粒型 β -葡聚糖还可在体外和体内启动 CR3，从而产生细胞毒性。

天然杀伤细胞是先天免疫系统中的重要组成部分，天然杀伤细胞通过 Fas 配体或通过形成 MAC 络合物并插入诱导脱噬作用的酶来刺激脱噬作用，从而杀死肿瘤细胞。天然杀伤细胞通过瞄准由于肿瘤作用或病毒作用而失去 MHC 蛋白的细胞而恢复巨噬细胞的活性。对于天然细胞的 CR3 依赖型细胞毒性而言，还需要与目标细胞相结合的 CR3。图 6 表明的是对从 12 个患者身上

新取下的肿瘤进行试验的结果，通过这些试验确定肿瘤细胞是否带有足够数量的 C3，其中带有可溶性酵母多糖启动过的 CR3 的天然杀伤细胞在识别肿瘤细胞和产生细胞毒性时需要足够数量的 C3。使用铬 ⁵¹ 对新鲜的有活性的肿瘤细胞悬浮液进行示踪，并对该悬浮液受天然杀伤细胞细胞毒性的影响程度进行测试，其中的天然杀伤细胞是从正常的不相关的个体身体上取得的，并在 37℃ 下经过 4 小时的培养。在可溶性酵母多糖中加入 β -葡聚糖可有力地加强天然杀伤细胞的活性。虽然在未被激活的天然杀伤细胞中没有发现明显的细胞毒性，但使用 2.0 微克/毫升的可溶性酵母多糖对天然杀伤细胞进行处理可使天然杀伤细胞的细胞毒性从 32% 上升到了 54%。随肿瘤细胞一同被取下的正常乳房表皮细胞的存在可能会阻止细胞毒性达到较高的水平，其中正常的乳房表皮细胞是 C3 阴性细胞。

图 7 表明的是 β -葡聚糖疗法的疗效，该图表明了 β -葡聚糖疗法对 Balb/c 小鼠的 Ptas64 乳腺癌进行治疗的结果。在该项实验中可溶性酵母多糖 m (β -甘露多糖中富含的可溶性酵母多糖) 被用作 β -葡聚糖的来源。Ptas64 乳腺癌被植入到 Balb/c 小鼠体内。在 6 次实验中，每次实验室用两组小鼠，每组由 6 只小鼠组成。在每次实验中，每天通过腹膜内注射或静脉注射方式对两组小鼠使用 200 微克的可溶性酵母多糖 (可溶性酵母多糖 m)。由 6 只小鼠组成的对照组每天通过静脉注射方式接受磷酸盐缓冲盐水。使用可溶性酵母多糖 m 对 30 只小鼠进行三次实验，然后再使用不含 LPS 的可溶性酵母多糖 m 对另外 90 只小鼠进行三次同样的实验。在每次实验后测定治疗组小鼠的平均肿瘤重量，并与对照组小鼠的平均肿瘤重量进行比较。图 7 中的每根棒图代表的是每个治疗组的平均值 \pm 标准偏差。正如可以看到的，对于腹膜内注射 β -葡聚糖和静脉注射 β -葡聚糖的情况而言，肿瘤重量分别急剧减少到了原重量的 4% 和 10%。此外，在使用不含 LPS 的

可溶性酵母多糖 m 所进行的实验中, 由于 LPS 的原因没有出现肿瘤消退现象, LPS 是一种众所周知的免疫促进剂。

图 8 表明的是 β -葡聚糖疗法既需要肿瘤细胞上带有 C3 同时也需要白细胞带有 CR3。使用植入 MMT 乳腺癌细胞并缺乏 C3 的 129/J 小鼠进行实验可以证实 β -葡聚糖疗法需要 C3。在该项实验中, 在 12 只正常 (C3+/+) 的 129/J 小鼠和 12 只缺乏 C3 的 129/J 小鼠体内植入 MMT 乳腺癌细胞系, 在小鼠体内出现了可察觉到的癌肿后对小鼠进行治疗, 每组小鼠由 6 只小鼠组成, 一组小鼠通过每天静脉注射磷酸盐缓冲盐水进行治疗, 另一组小鼠通过每天静脉注射 β -葡聚糖进行治疗。使用同样的方法对植入 Ptas64 乳腺肿瘤细胞的正常 (CD+/+) 小鼠和乏 CD3(没有 CD//b,CD//b/-) 的 Balb/c 小鼠进行试验。正如图中所示的, β -葡聚糖疗法可使正常 129/J 小鼠体内的肿瘤减少 79%, 这与正常 Blab/c 小鼠的结果是相似的。对肿瘤进行的流式细胞测定表明, 在 80% 以上的肿瘤细胞上沉积有大量的 C3。相比之下, 在缺乏 C3 的 129/J 小鼠中肿瘤没有出现明显的减小, 肿瘤细胞上没有 C3。肿瘤细胞上存在的免疫球蛋白 G 的相对数量在正常小鼠和缺乏 C3 的小鼠间并无差别, 通过染色测试可以证实这一点。

下一步是要证明 β -葡聚糖可用来增强单克隆疗法的疗效。这些实验的结果在图 9 中表明, 该图表明了 β -葡聚糖可以增强抗肿瘤的单克隆抗体对肝脏 EL-4 淋巴瘤的疗效。之所以测试 EL-4 淋巴瘤对 β -葡聚糖疗法的响应是因为这种肿瘤与其他肿瘤不同, 该同系基因型宿主 (C57BL/6) 并不表达天然抗体, 其他的天然抗体使用 C3 调理肿瘤细胞。在实验中通过静脉注射方式向小鼠体内注入 EL-4 细胞, 这是导致肝脏发生同质蜕变的已知方法。在注入 EL-4 细胞 10 天后, 每天通过静脉注射方式对小鼠使用 β -葡聚糖、抗 GD2 神经节苷脂 (EL-4 细胞的主要肿瘤抗原)

的 3F8 单克隆抗体或 β -葡聚糖加 3F8 单克隆抗体。3F8 单克隆抗体是免疫球蛋白 G3，该抗体是强力的补体激活剂，该抗体还调节抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。正如其他实验已经表明的，单独使用 3F8 就可使 EL-4 肝脏肿瘤得到明显的退化（减小 73.5%）。正如所预料的，由于肿瘤细胞带有很少 iC3b 或没有 iC3b，所以单独使用 β -葡聚糖几乎没有效果。然而，同单独使用 3F8 相比，联合使用 β -葡聚糖和 3F8 可使肝脏肿瘤出现更显著的消退。

图 10 表明的是大麦产生的 β -葡聚糖（大麦通常产生（1, 3），（1, 4）- β -D-葡聚糖）也可以增强单克隆抗体的抗肿瘤活性。通过皮下异种嫁接方式在无胸腺 Balb/c 小鼠体内植入成神经细胞肿瘤细胞。每 5 只小鼠组成一组，在植入肿瘤细胞 2 周后当肿瘤的直径达到 0.7~0.8 厘米时开始进行治疗。在使用 β -葡聚糖进行治疗的小组中，每天口服 400 微克的 β -葡聚糖，治疗期为 21~29 天。单克隆抗体（3F8）通过静脉注射方式给药，用药量为每周 2 次，每次 200 微克。从治疗的第一天开始测量肿瘤的大小。所测得的最大直径被表达为第零天肿瘤直径的百分数。正如可以看到的，无论是单独使用 β -葡聚糖还是单独使用单克隆抗体都没有取得较大的效果。然而，当 β -葡聚糖和单克隆抗体联合使用时，肿瘤的生长得到了明显的抑制。

表 1. 蔗糖和中性粒细胞被异硫氰酸荧光素示踪多糖荧光染色的
CR3 特性

异硫氰酸荧光素 示踪的多糖类型	最大特异性荧光 染色（受体的结 合位点达到饱和 状态）所需的多 糖-异硫氰酸荧 光素浓度	在饱和状态下 （在有过量未示 踪多糖存在下 所得到的总-非 特异性荧光性） 特异性荧光性 平均通道	特异性荧光 性抑制% 由可溶性酵 母多糖导致 的抑制（50 微克/毫升）	由 MN-41 抗 CR3 导致的 抑制（50 微 克/毫升）
右旋糖酐-异硫氰 酸荧光素	没有特异性染色	0	未测到	未测到
α -甘露多糖-异硫 氰酸荧光素	没有特异性染色	0	未测到	未测到
大麦 β -葡聚糖-异 硫氰酸荧光素	10	12.8	92.3	94.5
CM β -葡聚糖-异 硫氰酸荧光素	5	22.2	87.8	78.9
昆布多糖-异硫氰 酸荧光素	10	38.2	91.5	89.9
蘑菇多糖-异硫氰 酸荧光素	5	21.5	96.3	81.0
MP β -葡聚糖-异 硫氰酸荧光素	2	50.9	100	96.1
可溶性酵母多糖- 异硫氰酸荧光素	2	175	99.8	77.4

表 1 所表明的是各种来源的 β -葡聚糖的蔗糖特异性,同时还表明了流式细胞测定仪对各种纯 β -葡聚糖-异硫氰酸荧光素制剂的测定结果。右旋糖酐-异硫氰酸荧光素和 α -甘露多糖-异硫氰酸荧光素没有出现特异性染色。即使每种多糖-异硫氰酸荧光素制剂所产生的中性粒细胞染色强度比可溶性酵母多糖-异硫氰酸荧

光素的染色强度低，每种多糖-异硫氰酸荧光素的荧光性也同样受到过量未踪同源 β -葡聚糖、未示踪的可溶性酵母多糖或抗CR3的抑制。对达到最大染色程度所需的多糖浓度进行的比较表明，由于可溶性酵母多糖或MP β -葡聚糖（从分子探针得到的可溶性 β -葡聚糖）中任何一个达到饱和状态需要浓度为2微克/毫升的己糖，所以可溶性酵母多糖和MP β -葡聚糖具有最强的亲和力。由于异硫氰酸荧光素与多糖的摩尔比有可能发生变化，并且不容易通过计算得到，所以单独多糖-异硫氰酸荧光素所产生的荧光强度值无法进行比较。

对可溶性酵母多糖-异硫氰酸荧光素染色程度抑制50%所需 β -葡聚糖浓度进行比较可以得出：CR3对可溶性酵母多糖的亲和力比 β -葡聚糖对可溶性酵母多糖的亲和力高。中性粒细胞在4℃和不同浓度的 β -葡聚糖（可溶性酵母多糖、昆布多糖、MP β -葡聚糖、大麦 β -葡聚糖和蘑菇多糖）、 α -甘露多糖或右旋糖酐条件下培养15分钟，然后加入1.0毫克/毫升的可溶性酵母多糖-异硫氰酸荧光素进行染色，然后再在4℃下培养15分钟。然后对抑制百分数和多糖浓度进行比较。虽然将可溶性酵母多糖-异硫氰酸荧光素染色程度抑制50%需要0.2微克/毫升的己糖，但未示踪的 β -葡聚糖要将可溶性酵母多糖-异硫氰酸荧光素染色程度抑制50%需要5毫克/毫升的己糖（MP β -葡聚糖或昆布多糖）到75微克/毫升的己糖（蘑菇多糖）。当对相同的未示踪多糖抑制昆布多糖 β -葡聚糖-异硫氰酸荧光素染色进行测试时可以得到相似的结果。在两个试验中抑制活性的排位的是：可溶性酵母多糖>昆布多糖>MP β -葡聚糖。然而，CM β -葡聚糖（从酵母得到的羧甲基 β -葡聚糖）、大麦 β -葡聚糖和蘑菇多糖抑制昆布多糖-异硫氰酸荧光素染色的效率高于其抑制可溶性酵母多糖-异硫氰酸荧光素染色的效率。总之，这些结果表明大麦 β -葡聚糖对CR3

的亲合力相对低于可溶性酵母 MP β -葡聚糖或可溶性酵母多糖对 CR3 的亲合力。

正如表 1 所示的，大麦 β -葡聚糖对 CR3 的亲合力低于酵母 β -葡聚糖对 CR3 的亲合力。图 11 表明了酵母 β -葡聚糖和大麦 β -葡聚糖在单独使用时和与抗 GD2 神经节苷脂单克隆抗体联合使用时这两种 β -葡聚糖抗肿瘤效果的比较结果，其中 GD2 神经节苷脂是 RMA-S 淋巴瘤表达的肿瘤抗原。可溶性葡聚糖的用药剂量为 10 毫克/公斤，大麦 β -葡聚糖的用药剂量为 60 毫克/公斤。结果表明，单独使用可溶性葡聚糖比单独使用大麦 β -葡聚糖更有效。可溶性葡聚糖的单位重量效率明显更高。当与单克隆抗体联合使用时，可溶性葡聚糖还能更快地抑制肿瘤，可溶性葡聚糖比大麦 β -葡聚糖早 5 天使肿瘤的直径减小到 2 毫米。对使用抗 GD2 单克隆抗体和可溶性葡聚糖 β -葡聚糖进行治疗的小鼠进行目测观察还可发现在接受 B5 非特异性单克隆抗体治疗的对比小鼠间存在着较大的差别。虽然对比小鼠长出了大的致死性肿瘤，但使用可溶性葡聚糖和单克隆抗体治疗的小鼠只有很小的肿瘤，或者未出现肿瘤，其中 50% 的小鼠可以长期存活。综合来看，这些结果表明可溶性葡聚糖比大麦 β -葡聚糖具有明显的优势。

然后使用静脉注射单克隆抗体和口服各种浓度的全葡聚糖颗粒或通过静脉注射单克隆抗体和静脉注射可溶性葡聚糖对患乳腺癌的 Blab/c 小鼠进行治疗，从而确定这两种组合给药方式在体内产生的相对活性，图 12 表明了治疗结果。从图 12 中可以看出，无论是采用口服给药方式还是采用静脉注射给药方式，可溶性葡聚糖和全葡聚糖颗粒都有效。可溶性葡聚糖和全葡聚糖颗粒的效力大致相似，相对于其他全葡聚糖颗粒剂量而言，口服 400 微克全葡聚糖颗粒达到的活性最高。对小鼠的目测观察也证实了这些结果。在接受单克隆 11C1 静脉注射的对比小鼠中，肿瘤的

直径约为 9 毫米。在接受单克隆抗体 11C1 静脉注射和可溶性葡聚糖静脉注射的 5 只小鼠中，有 4 只小鼠没有出现可见的肿瘤。在接受单克隆抗体 11C1 静脉注射外加每天口服 200 微克全葡聚糖颗粒的小鼠中，肿瘤大小只是对照小鼠肿瘤大小的 20%，5 只小鼠中有 2 只小鼠几乎没有可见的肿瘤。

天然杀伤细胞在调节宿主抵抗力方面的作用包括直接杀灭肿瘤细胞和分泌诸如肿瘤坏死因子- α 和干扰素- γ 这样的细胞因子，这些细胞因子可以潜在地调节免疫反应以及补充杀灭肿瘤的巨噬细胞。虽然通过激活 CR3 可以调节天然杀伤细胞对肿瘤的直接杀灭毒性，但其他的研究表明激活 CR3 也可触发细胞因子的分泌。为证实这一点，研究人员进行了相关实验，图 13 表明了实验结果。图 13 表明了 β -葡聚糖对天然杀伤细胞分泌肿瘤细胞坏死因子- α 的 CR3 依赖性刺激。人类天然杀伤细胞或者使用颗粒状酵母 β -葡聚糖或使用可溶性 CR3 结合多糖在 37°C 下培养 18 小时。然后使用联免疫吸附测定法对培养上清液进行了分析。颗粒状酵母 β -葡聚糖（2 微克/毫升）和灰树花多糖（由多叶奇果菌产生的 500Kda 可溶性 β -葡聚糖，2 微克/毫升）能够与表面 CR3 分子上的凝集素位点相结合和形成交联，从而激活细胞分泌肿瘤坏死因子- α 和白细胞间素-6（未在图中表明）。相比之下，小的（20KDa）可溶性酵母 β -葡聚糖（MP β -葡聚糖，2.0 微克/毫升）和可溶性酵母多糖（含有 β -低甘露聚糖和/或 β -葡聚糖的可溶性酵母多糖制剂，2.0 微克/毫升）只与单个的 CR3 分子相结合，在缺乏靶细胞的情况下不会促进细胞的因子的释放。与天然杀伤细胞 CR3 依赖型细胞毒性一样，小 β -葡聚糖与 CR3 的结合可导致受体的启动，受体的启动是此后释放细胞因子所需的条件，与 iC3b 调理过的靶细胞（使用 iC3b-“+EC3b”调理过的羊体红细胞）形成配位连接可触发细胞因子的释放。EC3bi 靶细胞在缺乏多糖启动作用的情况下不会触发天然杀伤细胞释放细胞因

子。在多糖启动 CR3 之后，与 iC3b 靶细胞形成配位连接可诱导天然杀伤细胞分泌肿瘤坏死因子- α 、干扰素- γ 干扰素- α 和白细胞间素-6。加入浓度为 5 毫克/毫升的抗 CD11b 单克隆抗体可阻止天然杀伤细胞分泌这四种细胞因子。抗 CR3 可阻止 β -葡聚糖与 CR3 的结合，并可阻止经过启动的 CR3 与 EC3bi 靶细胞上的 iC3b 结合。

图 3 表明了这些结果，天然细胞分泌细胞因子与 CR3 被激活而产生细胞毒性是同步发生的。颗粒型 β -葡聚糖可强力触发 CR3 依赖型中性细胞过氧化物的爆发，颗粒型 β -葡聚糖同样会触发天然杀伤细胞释放出 CR3 依赖型细胞因子。细胞因子的分泌不是与 CR3 的初始启动过程同时发生的，CR3 的初始启动过程是与小型可溶性 β -葡聚糖与 CR3 结合的过程同时进行的，在经过 β -葡聚糖启动的 CR3 与 iC3b 调理过的靶细胞形成交联接连所触发的 CR3 激活步骤后，天然杀伤细胞才分泌细胞因子。使用 EC3bi 在介质中单独培养天然杀伤细胞并不会刺激天然杀伤细胞溶解 EC3bi，也不会触发天然杀伤细胞分泌细胞因子。然而，在使用可溶性（或颗粒型） β -葡聚糖启动天然杀伤细胞的 CR3 后加入 EC3bi，使用联免疫吸附测定法可检测到分泌出的肿瘤坏死因子- α 、干扰素- α 、干扰素- γ 和白细胞间素-6。分泌这些细胞因子依赖于 CR3，因为当同时加入靶目标 EC3bi 和 CD121b 单克隆抗体时，细胞因子的分泌会遭到抑制。

这一数据进一步说明了 β -葡聚糖在癌症免疫疗法中的成功应用。除了当经过 β -葡聚糖启动过的天然杀伤细胞进入到 iC3b 调理过的肿瘤细胞中时可触发细胞毒性外，这种由 iC3b 调理过的肿瘤细胞所刺激产生的局部细胞毒性还伴随细胞因子的分泌，但细胞因子的分泌是局部的，并不是全身性的。这种肿瘤内细胞因子的局部分泌还有助于 β -葡聚糖促进 T 细胞对细胞抗源的识

别。虽然不为理论所限制，但这可以解释使用可溶性葡聚糖和全葡聚糖颗粒所产生的协同作用，可溶性葡聚糖和全葡聚糖颗粒可以刺激不同的免疫细胞行为。正如本文前面所述的，形成交联以及随后的细胞因子分泌需要较大的 β -葡聚糖，但较小的 β -葡聚糖能够更有效地通过 CR3 结合来刺激细胞介导的细胞毒性。正如本发明中的情况一样，当两种不同的系统受到作用时，通常可获得协同效果，但当两种药剂作用于同一系统时，这种累加效果更加普遍。

本发明的另一重量方面是口服 β （1，3）葡聚糖能够诱导获得性免疫系统反应中 Th2 反应向 Th1 反应转变，其中口服 β （1，3）葡聚糖使用的是全葡聚糖颗粒。图 14 表明了这种转变，该图表明了患乳腺癌小鼠口服全葡聚糖颗粒时，肿瘤诱导的 Th2 反应转变成了 Th1 反应。Th1 和 Th2 变型辅助细胞在受到刺激时可释放出不同的细胞因子。其中 Th1 分泌出白细胞间素-2、干扰素- γ 和肿瘤坏死因子；Th2 分泌出白细胞间素-4、白细胞间素-5 和白细胞间素-10。白细胞间素-2 是 Th1 细胞的生长因子，而白细胞间素-4 是 Th2 细胞的生长因子。图 14 的第 1 部分表明的是，在未受到肿瘤细胞激活时处于自然状态的细胞。荧光染色可以证实缺乏 CD4⁺ 的 T 细胞，但这些 T 细胞带有细胞质白细胞间素-4。然后在小鼠体内植入乳腺癌细胞，并在植入癌细胞后 12 天采集小鼠的血样。这些小鼠的血样表明小鼠的血液中存在制造白细胞间素-4 的 T 细胞，这表明小鼠体内存在着 Th2 免疫反应。然后通过口服全葡聚糖颗粒方式对小鼠进行治疗，并在治疗 2 天后再次采集血样。再次采集的血样表明白细胞间素-4 已经消失，这表明 Th2 免疫反应已转变成 Th1 免疫反应。Th1 反应是抗肿瘤反应，Th2 反应向 Th1 反应的转变可加强获得性免疫系统的抗肿瘤反应，肿瘤细胞可以抵御补体介导的细胞毒性，但很容易受到细胞毒性杀伤细胞 T 细胞反应的破坏。

实例 2

材料和方法

抗体和其他试剂

Hiroshi Fugii 博士（纽约州 Buffalo, Roswell Park 癌症研究院分子免疫学分部）慷慨地提供了产生杂交瘤的抗小鼠乳房肿瘤病毒 11C1 免疫球蛋白 G2a（见 Raychaudhuri S.等人在《免疫学》杂志上发表的文章，137: 1743-1749(1986)）。Nai-Kong V. Cheung 博士（纽约 Sloan-Deterring 癌症中心）慷慨提供了 3F8 免疫球蛋白 G3 抗 GD 神经节苷脂单克隆抗体（见 Saito M.、Yu R. K 和 Cheung N-K. V.在《生物化学生物物理研究通讯》上发表的文章），该单克隆抗体经过提纯处理并存在于无菌的柠檬酸盐缓冲盐水中。Ralph A. Reisfeld 博士（加州 Scripps 临床研究院）慷慨提供了高纯 14.G2a 免疫球蛋白 G2a 抗 GD2 单克隆抗体（见 Hank J. A.等人在《癌症研究》上发表的文章，50: 5234-5239，1990，见 Uttenreuthetr-Fischer M.和 M. Huang 等人在《癌症免疫疗法》上发表的文章，41: 29-36，1995）以及杂交瘤。Ian F. C. McKenzie（澳大利亚 Austin 研究院）提供了产生免疫球蛋白 G2b 抗人类 MUC1 单克隆抗体的 BCP8 杂交瘤（见 Xing P. X.等人在《癌症研究》上发表的文章，52: 2310-2317（1992））。Emil Umanue 博士（华盛顿大学医学院）提供了产生鼠源性抗鼠类粒性白细胞单克隆抗体 RB6-8C5(LY-6G-抗 GR-1)（见 Hestdal K.等人在《免疫学》上发表的文章，147: 22-28，（1991））。分泌鼠源性免疫球蛋白 G2a 单克隆抗体的 B5 杂交瘤从美国标准菌库中获得。其中鼠源性免疫球蛋白 G2a 单克隆抗体对人类的高分子量黑色素瘤抗原具有特异性。分离出的免疫球蛋白 G 在小鼠肿瘤疗法中被用作“非特异性”单克隆抗体对照物。每种杂交瘤在 1~2%的 FCS 和 BD 杂交瘤介质中生长，然后在生物反应器中生长，从而生成

富含单克隆抗体的培养后介质，随后按硫酸铵沉淀、单-Q 快速蛋白液相色谱法和单-S 快速蛋白液相色谱法这一顺序对单克隆抗体进行提纯。提纯后的单克隆抗体通过超滤过程进行消毒，并使用 Triton X-114(见 Aida Y.和 Pabst M. J.等人在《免疫方法》上发表的文章，132: 191-195 (1990))进行萃取而去除可察觉到的 LPS。

羊源性抗鼠体抗体免疫球蛋白 M、免疫球蛋白 G 和异硫氰酸荧光素示踪的 C3 从 ICN Biomedicals/Cappel 购买，这些物质被用于使用流式细胞测定仪对免疫球蛋白和经过 C3 调理过的肿瘤细胞悬浮液的分析。抗鼠体 CD45-PerCP-Cy5.5、抗鼠体 CD80-异硫氰酸荧光素、抗 Gr-1-PE、抗鼠体 CD11-异硫氰酸荧光素以及正确示踪的同类型对照物从 BD Biosciences Pharmingen 购买。鼠源性抗鼠体 F4/80-异硫氰酸荧光素及其同类型对照物从 Caltag 实验室获得。

治疗所用的 β -葡聚糖

可溶性 β -葡聚糖制剂被称为“可溶性酵母多糖”，其大小约在 6KD，可溶性酵母多糖由酵母多糖经过甲酸萃取以及前面所述的单-Q 快速蛋白液相色谱法而生成（见 Xia Y.等人在《免疫学》上发表的文章，162: 2281-2290 (1999)）；见 Thornton B. P.等人在《免疫学》上发表的文章，156: 1235-1246 (1996)。可溶性酵母多糖被用于本文附图所示的肿瘤免疫疗法中。在其他治疗方法中，可溶性 β -葡聚糖被称为 NSGTM β -葡聚糖（中性可溶性葡聚糖），其大小约在 10KD，该葡聚糖是从明尼苏达州的生物聚合物工程公司获得的。可溶性葡聚糖是由面包酵母衍生出来的，可溶性葡聚糖来自于 Alpha Beta 技术公司几年前生产出的一批原料，该可溶性葡聚糖与 Alpha Beta 技术公司大约 7 年前通过分子探针公司销售的可溶性酵母 β -葡聚糖相似。以前的出版物

(Vetvicka V.等人在《临床研究》上发表的文章, 98: 50-61, Xia Y.等人在《免疫学》上发表的文章, 162: 2281-2290 (1999), Thornton B. P.等人在《免疫学》上发表的文章, 156: 1235-1246 (1996)) 对后一种葡聚糖在毒杀 iC3b 调理过的肿瘤细胞过程中与人源性 CR3 和鼠源性 CR3 的结合能力以及启动人源性 CR3 和鼠源性 CR3 的能力进行了说明。

小鼠和肿瘤模型

正常的 Balb/c 和 C57BL/6 小鼠购自于 Jackson 实验室或 NCI-Frederick 公司。缺乏 C3 的杂种小鼠 ($C3^{+/-}$) 购自于 Jackson 实验室, 这些小鼠被用来建立繁殖种群, 从该种群中衍生出缺乏 C3 的纯种小鼠 ($C3^{-/-}$) 以及它们的野生型 ($C3^{+/+}$) C57BL/6 同胞。缺乏 CR3 ($CD11b^{-/-}$) 的 C57BL/6 小鼠 (见 Coxon A.和 Rieu 等人在《免疫》上发表的文章, 5: 553-666, (1996) 及其野生型 ($CD11b^{+/+}$) C57BL/6 同胞仔的繁殖种群是从 Tanya Mayadas-Norton 博士 (波士顿 Brigham 妇女医院和 Harvard 医学校) 获得的。通过分别使用定量半径免疫扩散法对血清 C3 进行分析以及使用免疫荧光染色法和流式细胞测定仪对血液中粒细胞 CD11b 的表达进行分析来证实 $C3^{-/-}$ 和 $CR3^{-/-}$ 的表型及其同胞小鼠。

Blab/c 乳腺癌被称为 Ptas64(或 64PT), 这种癌细胞是从 Wei-Zen Wei 博士 (底特律 Karmonos 癌症中心和 Wayne 州立大学) 获得的。该肿瘤细胞系表达小鼠乳房肿瘤病毒 (鼠源性乳腺肿瘤病毒) 膜抗原, 使用 11C1 单克隆抗体可检测到这种膜抗原。以前的研究表明, 正常 Blab/C 小鼠血清中含有自然存在的抗体, 这些抗体能与 Ptas64 发生反应, 这些抗体通过免疫球蛋白 M、免疫球蛋白 G 和 C3 来调理肿瘤细胞在体内的生长; 以前的研究还表明, 静脉注射 11C1 单克隆抗体可提高细胞表面对免疫球蛋白

G 和 C3 的吸收量 (见 Yan J.等人在《免疫学》上发表的文章, 163: 3045-3052 (1990))。在每组由 6~8 只小鼠组成的四组小鼠的乳腺脂肪垫内, 通过皮下注射方式植入 1.0×10^6 个肿瘤细胞, 并使肿瘤细胞在小鼠体内生长 7~10 天。当使用测径器测得肿瘤的平均长度和宽度达到 3~4 毫米时开始对小鼠进行治疗。这四组小鼠包括: 1) 接受磷酸盐缓冲盐水静脉注射和非特异性单克隆抗体静脉注射的对比组; 2) 每隔 2 天静脉注射 100 微升 11C1 单克隆抗体盐水溶液的小鼠组; 3) 每天静脉注射 100 微升 β -葡聚糖 (可溶性葡聚糖, 3 毫克/毫升) 的小鼠组; 4) 每隔 2 天静脉注射 11C1 单克隆抗体同时每天注射 β -葡聚糖的小鼠组。每隔 2 天对肿瘤的大小进行一次测量, 当肿瘤直径达到 15 毫米时杀死小鼠。

高度表达膜 GD2 神经节苷脂的 C57BL/6 淋巴瘤 EL-4 由 Nai-Kong V. Cheung 博士提供。通过静脉注射方式向正常的 C57BL/6 小鼠体内植入 3×10^5 个 EL-4 细胞, 从而使小鼠长出肝脏肿瘤 (见 Zhang H.等人在《癌症研究》上发表的文章, 58: 2844-2849 (1998))。10 天后, 由 6 只小鼠构成一组的四组小鼠通过静脉注射方式接受 100 微升的: a) 磷酸盐缓冲盐水 (对比组), b) 可溶性酵母多糖 β -葡聚糖 (4 毫克/毫升), 每天一次, c) 抗 GD2 神经节苷脂的 3F8 单克隆抗体 (2 毫克/毫升), 每隔 2 天注射一次, d) 每天注射 β -葡聚糖并每隔 2 天注射一次 3F8 单克隆抗体。在治疗 2 星期后, 取出接受治疗小鼠的肝脏并对其进行称重, 然后与正常的未患肿瘤的小鼠肝脏进行比较。用患有肿瘤小鼠的肝脏重量减去正常小鼠的肝脏重量 (1.0 克) 可以得出肝脏肿瘤的净重量。使用 C57BL/6 淋巴瘤 RMA-S 进行类似的肝脏肿瘤模型实验, 淋巴瘤 RMA-S 同样表达 GD2 神经节苷脂, 但在 I 型 MHC (由匹斯堡癌症研究院的 Olivera J. Finn 博士提供) 联合抗 GD2 神经节苷脂 (100 微克, 每隔 2 天静脉注射一次) 的

14.G2a 单克隆抗体的肽加载方面存在着缺陷。小鼠同样也被分成四组，在静脉注射 3×10^5 个 RMA-S 肿瘤细胞 5 天后开始使用以下方式进行治疗：1) 静脉注射磷酸盐缓冲盐水（对比组）；2) 静脉注射 β -葡聚糖（第天 400 微克）；3) 14.G2a 单克隆抗体；4) 可溶性葡聚糖 β -葡聚糖和 14.G2a 单克隆抗体。治疗持续 3 个星期，然后对小鼠的存活期进行长期观察。

转染了人类 MUC1 的 RMA-S 肿瘤细胞也由 Finn 博士提供，通过皮下植入方式在 C57BL/6 小鼠的乳房脂肪垫内或脂肪垫附近植入 1×10^6 个 RMA-S 肿瘤细胞。在植入肿瘤细胞后 8-10 天，小鼠的体内出现了 3~4 毫米的肿瘤，此时使用 14.2a 抗 GD2 神经节苷脂的单克隆抗体或 BCP8 抗 MUC1 单克隆抗体在联合使用可溶性 β -葡聚糖或不联合使用可溶性 β -葡聚糖的情况下对四组小鼠进行治疗。四组小鼠的治疗方式如下：a) 每隔 2 天通过静脉注射方式对对比组小鼠使用 200 微克的 B5 非特异性单克隆抗体，b) 每天静脉注射 400 微克的可溶性葡聚糖 β -葡聚糖，c) 每隔 2 天静脉注射 100 微克的 14.G2a 抗 GD2 神经节苷脂单克隆抗体或 200 微克的 BCP8 抗 MUC1 单克隆抗体，d) 联合使用单克隆抗体和 β -葡聚糖进行治疗。治疗持续 2 星期或 3 星期，然后按前面所述的过程测量肿瘤，当肿瘤直径达到 15 毫米时杀死小鼠。对没有肿瘤的小鼠进行为期 90~120 天的生存期观察。

由 C57BL/6 小鼠衍生出来的路易氏肺癌细胞（LL/2、CRL-1642）是从美国标准菌库中获得的。使该肺癌细胞转染含有人类 MUC1 CDNA 的质粒，该质粒由 Olivera Finn 博士提供。LL/2 细胞系均匀表达高表面强度的 MUC1，通过对 BCP8-异硫氰酸荧光素单克隆抗体染色的细胞进行荧光激活细胞分类而对 LL/2 细胞系进行选择。通过使该细胞系两次通过皮下方式经过 C57BL/6 小鼠而对该细胞系进行进一步的选择。被选用的肿瘤细

胞系既在表面上高度表达 MUC1, 同时又能够在植入 5×10^5 个肿瘤细胞的情况下在 C57BL/6 小鼠的皮下产生肿瘤。在植入肿瘤细胞 7 天后, 当肿瘤直径达到 1~2 毫米时开始对患皮下肿瘤的小鼠进行治疗。使用以下方式对四组缺乏 C3 的小鼠或它们的野生型同胞小鼠进行治疗; 其中每组由 6 只小鼠组成: a) 每隔 2 天静脉注射磷酸盐缓冲盐水 (对比组), b) 每天静脉注射 400 微克可溶性葡聚糖 β -葡聚糖, c) 每隔 2 天静脉注射 200 微克 BCP8 抗 MUC1 单克隆抗体, d) 联合使用 BCP8 抗 MUC1 单克隆抗体和可溶性葡聚糖 β -葡聚糖进行治疗。治疗过程持续 3 个星期, 其中每隔 2 天对肿瘤直径进行一次测量, 当肿瘤直径达到 15 毫米时杀死小鼠。对没有肿瘤的小鼠做为期 90 天的长期生存观察。

对患乳腺肿瘤小鼠的白细胞增多现象进行分析

选择 12 只 Balb/c 小鼠, 这 12 只小鼠分成两组, 每组有 6 只小鼠, 在其中一组小鼠的乳腺脂肪垫中植入 1×10^6 个 Ptas64 乳腺癌细胞, 然后对两组小鼠的外周血白细胞数量进行比较。在植入癌细胞 8 天后小鼠体内出现肿瘤时, 每隔一天收集小鼠的外周血进行分析。根据制造厂提供的使用说明使用 BD Tru-Count 管 (BD 生物科学公司生产) 对白细胞的绝对数量进行测定。简单地说, 50 微升的全血在 Tru-Count 管中被染色, 管中含有已知数量的珠球, 珠球带有 1.0 微升的 PerCP-Cy5.5 共轭鼠源性抗鼠体 CD45 单克隆抗体。在冰上保持 20 分钟后, 通过加入 450 微升荧光激活细胞分类溶解溶液 (BD 生物科学公司生产) 使白细胞溶解, 然后立即用 BD 荧光激活细胞分类扫描仪进行分析。在获取数据过程中, 建立 FL-3 的阈值, 在这一阈值的限制下, 扫描仪只对珠球和 CD45⁺ 细胞进行分析。白细胞的绝对数量由以下公式计算:

$$\frac{\text{在含白细胞区域内的事件数量}}{\text{绝对计数珠球区域内的事件数量}} \times \frac{\text{每次测试的珠球数量}}{\text{测试体积}} = \text{白细胞绝对数量}$$

对缺乏粒性白细胞小鼠的肿瘤进行治疗

使用前面所述的方法对 Balb/c 小鼠体内的 Ptas64 乳腺肿瘤进行实验，其中接受治疗的小鼠缺乏粒性白细胞，治疗过程包括使用鼠源性抗鼠体粒性白细胞单克隆抗体 RB6-8C5 进行治疗，这种单克隆抗体也被称为抗 Gr-1(见 Wipke B. T.和 Allen P. M.在《免疫学》上发表的文章，167: 1601-1608 (2001))。为了防止缺乏粒性白细胞的小鼠出现感染，所有接受治疗的小鼠均放置在层流通风橱中，并在小鼠的饮用水中加入抗生素四环素(每升水中加入 500 毫克四环素和 50 克蔗糖)。由于有效的肿瘤退化需要血清补体以 iC3b 对肿瘤进行调理，所以研究人员进行了实验研究从而确定慢性粒性白细胞缺乏症的症状。在对肿瘤开始进行治疗前，实验研究为血清补体功能的恢复留出了时间。在使用 11C1 单克隆抗体和可溶性葡聚糖 β -葡聚糖进行治疗之前 3 天，通过腹膜内注射方式给小鼠注入 300 微克的 RB6-8C5 单克隆抗体。在粒性白细胞开始出现缺乏后，每隔 3 天再以 RB6-8C5 单克隆抗体和 11C1 单克隆抗体混合物的形式通过静脉注射方式向小鼠体内注射 300 微克的 RB6-8C5，这样两种单克隆抗体可同时通过一次注射而进入到小鼠体内。对取自 RB6-8C5 治疗小鼠的血清进行测试表明，到第 3 天时补体的活性已恢复到正常水平，而 Wright-Giemsa 染色的外周血涂片表明实际上没有剩余的中性粒细胞或嗜曙红细胞。连续静脉注射 RB6-8C5 并不能明显影响血清补体的水平，因为粒性白细胞的数量太低以致不需要消耗大量的补体来产生细胞毒性。使用抗 C3-异硫氰酸荧光素染色法和流式细胞测定仪可以测定补体在体内通过 C3 对 11C1 调理过的

Ptas64 肿瘤细胞的调理能力,对接受 RB6-8C5 治疗小鼠的血清所进行的试验并没有证据表明在治疗肿瘤过程中出现了补体缺乏。为了证实 RB6-8C5 只消耗表面高浓度表达的 Gr-1 粒性白细胞,而不是消耗表面低浓度表达 Gr-1 的单核细胞、巨噬细胞和树突细胞,研究人员还对接受 RB6-8C5 治疗的小鼠进行了额外试验,从而核实在骨髓、脾脏和外周血中是否存在这些其他类型的骨髓细胞以及这些骨髓细胞的数量。使用流式细胞测定仪和抗 Gr-1-PE 及抗 CD80-异硫氰酸荧光素双重染色法在血样中识别到了单核细胞,使用 Gr-1-PE 和 T4/80-异硫氰酸荧光素识别到了巨噬细胞,使用抗 Gr-1-PE 和抗 CD11C-异硫氰酸荧光素识别到了树突细胞。

根据数据进行绘图以及数据的统计分析

肿瘤治疗的全部数据被输入 Prism3.0 (加州圣迭哥图板软件公司的软件),从而生成肿瘤退化或小鼠存活的图形。然后在 Prism3.0 进行 t 检验,从而确定不同数据组的重要性。

结果

使用 β -葡聚糖进行治疗需要抗肿瘤抗体

以前的研究表明, β -葡聚糖要取得疗效需要天生存在的抗肿瘤抗体,天然存在抗体的作用是用 iC3b 瞄准肿瘤细胞。人们以前假定 EL-4 淋巴瘤能够抵抗 β -葡聚糖疗法(见 Takahashi K.等人在《药理学》上发表的文章,11: 472-478, 1988, 见 Kano Y.等人在《生物疗法》上发表的文章,9: 241-247 (1996)),因为来自同源的 C57BL/6 宿主的血清中缺乏可检测到的可与 EL-4 反应的天然抗体。当通过静脉注射方式植入到小鼠体内时,EL-4 细胞在小鼠体内形成肝脏瘤(图 15)。在植入 EL-4 细胞 2 星期后

所进行的肝脏瘤细胞分析表明,小鼠体内没有或极少有流式细胞测定仪可检测到的免疫球蛋白 M、免疫球蛋白 G 或 C3 表面染色(数据未在图中表明)。单独使用静脉注射 β -葡聚糖对小鼠进行治疗只能使肝脏肿瘤的净重减少 25.6%。EL-4 细胞在表面表达密度高的 GD2 神经节苷脂, GD2 神经节苷脂是免疫球蛋白 G3 单克隆抗体 3F8 的靶目标, 免疫球蛋白 G3 单克隆抗体 3F8 既可以激活补体也能够明显调节抗体依赖型细胞毒性(见 Zhang H.等人在《癌症研究》上发表的文章, 58: 2844-2849 (1998))。由于肿瘤较小以及较早地使用了单克隆抗体(在植入肿瘤后 3 天内使用单克隆抗体), 所以 3F8 疗法完全消灭了肝脏肿瘤(见 Zhang H.等人在《癌症研究》上发表的文章, 58: 2844-2849 (1998))。然而, 当在植入肿瘤细胞 10 天后用 3F8 进行为期 2 周的治疗时, 肿瘤没有被完全消灭, 肿瘤的净重减少了 73.5%(图 15)。使用流式细胞测定仪对 3F8 治疗的小鼠肿瘤细胞进行的分析表明, 免疫球蛋白 G 和 C3 存在着大量的染色(未在图中表明)。最后, 与未经治疗的对比组相比, 同时静脉注射 3F8 和 β -葡聚糖使肿瘤的重量减少 94.3%, 同只接受 3F8 单克隆抗体治疗的小鼠相比, 同时使用 3F8 单克隆抗体和 β -葡聚糖治疗的小鼠的肿瘤重量减少了 76.5%。

对类似的肝脏肿瘤小鼠模型进行无肿瘤存活期观察, 该肝脏肿瘤小鼠模型集 RMA-S 淋巴瘤、C57BL/6 同源宿主和 14.G2a 抗 GD2 神经节苷脂的免疫球蛋白 G2a 单克隆抗体于一体。与 EL-4 细胞不同, RMA-S 肿瘤在 I 型 MHC 中加载肽的能力方面存在着缺陷, 因此 RMA-S 肿瘤细胞可防止自身被细胞毒性 T 淋巴细胞所识别和杀灭。单独使用 β -葡聚糖不能取得治疗效果, 但单独使用 14.G2a 进行治疗可以延长存活期。然而, 14.G2a 和 β -葡聚糖联合作用不仅能够延长小鼠的存活期, 而且可使 25% 的小鼠长期存活。

β -葡聚糖和单克隆抗体联合使用可显著增强肿瘤的退化以及明显延长存活期

使用 2 种类型的小鼠模型对 3 种单克隆抗体进行了检测，一种模型是患有 Ptas64 乳腺癌的同源 Balb/c 小鼠，另一种模型是在皮下植入了 RMA-S 淋巴瘤细胞的 C57BL/6 小鼠，其中的 RMA-S 淋巴瘤细胞转染了人类的 MUC1。Ptas64 潜在感染了小鼠乳房肿瘤病毒，并表达可被 11C1 免疫球蛋白 G2a 单克隆抗体检测到的膜表面小鼠乳房肿瘤病毒肿瘤抗原。试验研究表明，在手术切除肿瘤以及使用流式细胞测定仪进行分析（未在图中表明）后，每隔 3 天静脉注射 200 微克的 11C1 可使免疫球蛋白 G 和 C3 最大程度地包裹住单个乳腺肿瘤细胞。RMA-S-MUC1 细胞在表面表达高密度的 GD2 神经节苷酯，但 RMA-S-MUC1 对补体依赖型细胞毒性的抵抗性高于 EL-4 细胞（未在图中表明）。使用 14.G2a 进行的实验研究表明，在每隔 3 天使用 100 微克单克隆抗体的情况下，皮下肿瘤细胞吸收免疫球蛋白 G 和 C3 的数量达到最大。RMA-S 细胞转染人类 MUC1 还可使该肿瘤细胞成为 BCP8 免疫球蛋白 G2b 抗 MUC1 的靶目标。每隔 3 天使用 200 微克的 BCP8 可使免疫球蛋白 G 和 C3 最大程度地包裹皮下肿瘤（未在图中表明）。

无论是对于 Ptas64 还是 RMA-S 肿瘤细胞，同源的 Balb/c 和 C57BL/6 小鼠的血清中都含有可测量到的天然抗肿瘤抗体，这些抗体使用免疫球蛋白 M、免疫球蛋白 G 和 C3 对体内的肿瘤实体进行调理。因此，正如所预料的，当单独使用 β -葡聚糖对患有 Ptas64 或 RMA-S 肿瘤的小鼠进行治疗时，肿瘤出现了一定程度的退化（图 17）。同样，这 3 种单克隆抗体都能促使肿瘤细胞退化，其中 14.G2a 最为有效，这或许是因为 RMA-S 细胞具有的 GD2 抗原密度较高。当 RMA-S-MUC1 细胞被 BCP8 作为靶目标

而不是被 14.G2a 作为靶目标时, MUC1 抗原的较低表达被认为是造成肿瘤退化程度较低的原因。值得注意的是, 在这 3 种肿瘤模型中联合使用 β -葡聚糖可使肿瘤比单独使用单克隆抗体时取得更明显的退化(图 17)。在为期 2 周的治疗结束时, 对没有肿瘤的小鼠进行为期 4 个月的存活期观察(图 18)。尽管患 Ptas64 肿瘤小鼠的存活期得到了延长, 但所有的小鼠在 60 天内死于肿瘤。对这些小鼠的肿瘤所进行的分析表明, 许多肿瘤细胞不再与 11C1 单克隆抗体反应, 并且在体内不再是 iC3b 的靶目标。在另一系列的实验中, Ptas64 肿瘤细胞对小鼠乳房肿瘤病毒抗原高表达进行分类, 在 4 个星期内这一表达高达 3 倍, 从而产生比母细胞(未在图中表明)更高表达小鼠乳房肿瘤病毒的变种细胞系。对于这些高度表达小鼠乳房肿瘤病毒肿瘤抗原的细胞而言, 联合使用 11C1 单克隆抗体和 β -葡聚糖可使 40% 小鼠的存活期超过 90 天(未在图中表明)。

当单独使用 14.G2a 抗 GD2 神经苷脂单克隆抗体或联合使用该抗体和 β -葡聚糖对 RMA-S-MUC1 肿瘤进行治疗时, 单独使用单克隆抗体治疗的小鼠中有 60% 存活下来, 而使用单克隆抗体和 β -葡聚糖进行治疗的小鼠中, 有 80% 的小鼠存活下来(差别并不明显)。对该模型所进行治疗之所以取得了更好的疗效可能是因为 GD2 抗原的表达高并且表达稳定。当同样的肿瘤细胞是 BCP8 抗 MUC1 单克隆抗体的靶细胞时, 这种单克隆抗体对小鼠的存活率没有作用, 但当这种单克隆抗体与 β -葡聚糖共同使用时, 小鼠表现出了可比的 20% 的存活率。对取自这些小鼠的肿瘤细胞所进行的检验表明, 25% 以下的肿瘤细胞继续表达 MUC1, 这表明由于带有 MUC1 的肿瘤细胞已被这种疗法有选择性地杀灭了, 所以可能出现了肿瘤免疫逃逸现象。在植入肿瘤细胞之前, 使用荧光激活细胞分类术对 RMA-S-MUC1 细胞进行分类, 选择能够均匀表达 MUC1 的细胞用于肿瘤植入。

β -葡聚糖的辅助功能需要白细胞 CR3 和血清 C3

以前的研究表明，在缺乏 CR3 的 Balb/c 小鼠和缺乏 C3 的 129/J 小鼠中单独使用 β -葡聚糖并不能起到使肿瘤发生退化的功效。当前的研究分别对缺乏 CR3 或缺乏 C3 且皮下带有 RMA-S-MUC1 或 LL/2-MUC1 肿瘤的小鼠进行了检验。对于带有 RMA-S-MUC1 肿瘤的野生型小鼠而言，单独使用单克隆抗体或单独使用 β -葡聚糖所导致的肿瘤退化程度是可比的，当单克隆抗体和 β -葡聚糖联合使用时，肿瘤的退化会得到加强（图 19）。虽然使用 β -葡聚糖并不能明显加强单克隆抗体所介导的肿瘤退化，但单克隆和 β -葡聚糖联合使用时会明显延长存活期，在联合使用单克隆抗体和 β -葡聚糖进行治疗的小鼠中，有 40% 的小鼠没有肿瘤细胞（图 20）。相比这下，单独使用单克隆抗体进行治疗和单独 β -葡聚糖进行治疗的小鼠中没有小鼠存活下来。最后，在缺乏 CR3 的小鼠中，单独使用 β -葡聚糖进行治疗不能使肿瘤消退，虽然单独用单克隆抗体不能使肿瘤发生较大的消退，但单克隆抗体和 β -葡聚糖联合使用也不能使单克隆抗体引发的肿瘤消退得到加强，而且缺乏 CR3 的小鼠在接受治疗后没有出现长期存活的小鼠。

所研究的另一肿瘤模型是缺乏 C3 的野生型 C57BL/6 小鼠。在这种小鼠的体内通过皮下植入方式植入转染了人类 MUC1 (LL/2-MUC1) 的路易氏肺癌细胞，使用 BCP8 抗 MUC1 单克隆抗体或联合使用该抗体和 β -葡聚糖进行治疗。在野生型小鼠中，单独使用 BCP8 单克隆抗体不会使肿瘤消退，但 BCP8 单克隆抗体和 β -葡聚糖联合使用时会使肿瘤出现明显的消退 ($P < 0.05$, 图 21)。单独使用 β -葡聚糖进行治疗之所以使肿瘤只出现了较小的退化可能是因为天然存在的抗 LL/2 肿瘤细胞的抗体较少。同样， β -葡聚糖疗法或单克隆抗体与 β -葡聚糖联合疗法在存活期方面

要优于单独使用单克隆抗体的疗法（图 22）。相比之下，无论是单独使用还是联合使用单克隆抗体疗法和 β -葡聚糖疗法，都不能使缺乏 C3 的小鼠的存活情况得到改善。

β -葡聚糖介导的肿瘤退化依赖于粒性白细胞

以前的体外研究表明，人类和鼠类单核细胞/巨噬细胞、中性粒细胞和天然杀伤细胞都可以实现 β -葡聚糖介导的 CR3 依赖型细胞毒性，该细胞毒性对 iC3b 调理的肿瘤细胞发生作用。然而，在鼠类肿瘤模型中，识别这一响应所需的特异性效应细胞所做的尝试没有取得成功。补充白细胞所涉及的一个机理可能是位于肿瘤位点上补体的激活，这一激活过程是由抗肿瘤抗体所介导的，在大多数肿瘤模型中，补体的激活被认为是通过自然存在的抗体所实现的，即便在使用磷酸盐缓冲盐水治疗的对比组中也是同样的情况。实际上，患 Ptas64 乳腺癌小鼠的外周血中粒性白细胞数量出现了显著的增长，这种增长与单克隆抗体疗法和/或 β -葡聚糖疗法无关（图 23）。补体的激活会释放出 C3a 和 C5a，C3a 和 C5a 的功能是补充嗜曙细胞、肥大细胞（C3a 的功能）、中性粒细胞和巨噬细胞（C5a 的功能）。因此，在使用磷酸盐缓冲盐水进行治疗的对照组小鼠中也会取得相似的补充情况，但只有在接受 β -葡聚糖治疗的肿瘤中经过 CR3 启动的白细胞能够杀灭 iC3b 调理过的肿瘤细胞。

由于在 Ptas64 肿瘤细胞（接受治疗的或没有接受治疗的）中存在的主要白细胞类型是粒性白细胞，因此假定经 β -葡聚糖启动过的 CR3⁺粒性白细胞在单克隆抗体外加 β -葡聚糖介导的杀灭肿瘤活性方面起主导作用。以前有报道称，使用抗 Ly6G（抗 Gr-1）单克隆抗体治疗肿瘤会有选择性地消耗粒性白细胞（中性粒细胞和嗜曙红细胞），但对其他类型的白细胞没有影响或影响极小（见 Wipke B. T. 和 Allen P. M. 在《免疫学》上发表的文章，167：

1601-1608 (2001))。然而,已知的是,Gr-1 抗原在包括单核细胞/巨噬细胞以及树突细胞在内的所有的骨髓细胞种群中表达的水平都较低。因此,表明此项研究中所用的方法对粒性白细胞具有选择性以及这种疗法并不会耗尽单核细胞、巨噬细胞或树突细胞是很重要的。使用流式细胞测定仪对血液中的白细胞以及脾白细胞的检测证实,外周血中的粒性白细胞几乎被消耗殆尽(图 24A 和 24B)。然而,抗 Gr-1 单克隆抗体对骨髓中 Gr-1^{hi}粒性白细胞种群几乎没有影响。这些细胞被假定为一离开骨髓就会被杀死。使用流式细胞测定仪对外周血的检测表明 Gr-1^{hi}CD80⁺单核细胞没有出现消耗,而所有 Gr-1^{hi}CD80⁻中性粒细胞都消失了(图 24D)。对脾细胞进行的测试表明,Gr-1^{hi}CD80⁺巨噬细胞(图 24E)或 Gr-1^{hi}CD80⁺树突细胞(未在图中表明)没有出现可检测到的消耗。同样,骨髓中的巨噬细胞或树突细胞也没有出现消耗(未在图中表明)。

为了确定粒性白细胞在这种肿瘤免疫疗法中所起的作用,按前面所述的方式对患有 Ptas64 乳腺癌的 Balb/c 小鼠使用单克隆抗体和 β -葡聚糖疗法,但这些小鼠要么未被治愈,要么被抗 Gr-1 单克隆抗体耗尽了粒性白细胞。为了避免在抗 Gr-1 单克隆抗体杀灭抗体依赖型粒性白细胞的高峰期出现补体的耗尽,在开始使用单克隆抗体加 β -葡聚糖进行治疗前 3 天先使用腹膜内注射抗 Gr-1 对小鼠进行治疗,然后在静脉注射 11C1 单克隆抗体的同时静脉注射抗 Gr-1 单克隆抗体。通过使用抗鼠体 C3-异硫氰酸荧光素染色法和流式细胞测定仪确定小鼠的小血清试样在体内通过 C3 对 11C1 调理过的 Ptas64 肿瘤细胞的调理能力,通过确定这一能力可以在单克隆抗体加 β -葡聚糖疗法的开始阶段及治疗过程中监测血清补体的浓度。没有证据表明在抗 GR-1 治疗中补体出现缺乏(未在图中表明)。粒性白细胞的缺乏不仅会完全中止单克隆抗体和 β -葡聚糖所介导的肿瘤退化,而且在测量肿瘤的最

后一周内，缺乏粒性白细胞小鼠体内的肿瘤生长速度明显快于使用磷酸盐缓冲盐水治疗的对比组小鼠体内肿瘤的生长速度（图25）。因此，在单克隆抗体加 β -葡聚糖介导的疗法中，粒性白细胞（中性粒细胞和/或嗜曙红细胞）在促进肿瘤退化的过程中起着必不可少的作用。

讨论

这一研究表明，如果与 β -葡聚糖联合使用，抗肿瘤的单克隆抗体所介导的肿瘤退化和存活状况会得到显著的加强。 β -葡聚糖增强抗肿瘤单克隆抗体活性的能力需要单克隆抗体激活补体以及沉积在肿瘤细胞上，从而使肿瘤细胞被 $CR3^+$ 粒性白细胞所识别。

以前的报道表明， β -葡聚糖通过自然存在的抗肿瘤抗体而发挥单一疗法的作用，其中的抗体使 $iC3b$ 沉积在肿瘤细胞上，这种疗法对于天然抗肿瘤抗体浓度较低的年轻小鼠的疗效更差。这一疗法对患有遗传性严重综合免疫缺陷症（既没有B淋巴细胞和T淋巴细胞，并且无法产生天然抗体）的小鼠没有疗效，但通过静脉注射从正常小鼠血清中分离出的天然抗体可对这一治疗方法进行弥补。然而，即使在成年的野生型小鼠中，当肿瘤失去自然存在的抗体所识别的抗原以致于肿瘤细胞不再成为 $iC3b$ 的靶细胞时也会出现肿瘤逃逸现象。

在以前的研究中， β -葡聚糖介导的免疫疗法的疗效被认为可通过联合使用抗肿瘤单克隆抗体而得到加强，其中的抗肿瘤单克隆抗体对高表达的和稳定的肿瘤抗原具有特异性。通过实验可证实这些单克隆抗体需要激活补体，这些实验表明 β -葡聚糖不能加强缺乏C3小鼠体内单克隆抗体所介导的肿瘤的退化，也不能改善缺乏C3小鼠的存活情况。其他的实验也表明， β -葡聚糖对

不能激活补体的抗肿瘤单克隆抗体缺乏增强作用（见 Cheung N. K. 和 Modak 在《癌症临床研究》上发表的文章，8：1217-1223(2002)）。因此， β -葡聚糖不能增强某些人源化单克隆抗体的治疗活性，其中这些人源化单克隆抗体是通过不激活补体的方式进行处理。大多数含有人类免疫球蛋白 G1 Fc 区域的人源化单克隆抗体可以激活补体，比如赫塞汀TM、美罗华TM 和 ErbituTM 这些人源化单克隆抗体可激活补体（见 Spiridon C. I. 等人在《癌症临床研究》上发表的文章，8：1720-1730（2002），见 Idusogie E. E.等人在《免疫学》上发表的文章，164：4178-4184（2000）见 Cragg M. S.等人在《血液》上发表的文章，101：1045-1052（2003），见 Herbst R. S.和 Hong W. K.在《生殖肿瘤学》上发表的文章，29：18-30（2002））。除美罗华外，补体依赖型细胞毒性并不代表这些单克隆抗体杀灭肿瘤活性的主要机理， β -葡聚糖也不能改变补体依赖型细胞毒性的效力。取而代之的是， β -葡聚糖的作用是启动粒性白细胞杀灭肿瘤细胞，其中的肿瘤细胞是单克隆抗体介导的补体激活的靶目标，补体由肿瘤细胞表面所结合的 iC3b 所激活。

研究人员对 EL-4 淋巴瘤进行了检测，因为以前有报道称该淋巴瘤对蘑菇衍生出的 β -葡聚糖具有抵抗性（见 Takahashi K.等人在《Pharmacobiodyn》上发表的文章，11：472-478，1988）。这种抵抗力被认为是由于在同源 C57BL/6 宿主的血清中缺乏天然抗肿瘤抗体所导致的（见 Yan J.等人在《免疫学》上发表的文章，163：3045-3052（1999））。据报道，3F8 免疫球蛋白 G3 抗 GD2 神经节苷脂疗法可有效地保护小鼠不受静脉注射 EL-4 肿瘤细胞的影响，但这种保护作用只有在静脉注射 EL-4 肿瘤细胞后 3 天内使用这种单克隆抗体的条件下才有效（见 Zhang H.等人在《癌症研究》上发表的文章，58：2844-2849，（1998））。与大多数小鼠肿瘤不同，EL-4 对 3F8 单克隆抗体介导的补体依赖型细

胞毒性和抗体依赖细胞毒性十分敏感。然而，在静脉注射肿瘤细胞后 10 天开始使用 3F8 进行治疗时，所形成的肿瘤在使用 3F8 单克隆抗体的治疗下小鼠只存活了 2 星期。正如所预料的，单独使用 β -葡聚糖进行治疗对肿瘤的生长没有影响，其原因在于缺乏天然的抗肿瘤抗体，所以肿瘤细胞不是 iC3b 的靶目标。然而，对小鼠使用 3F8 单克隆抗体以及 β -葡聚糖可使肿瘤的退化程度明显高于单独使用 3F8 单克隆抗体所导致的肿瘤退化程度。

在细胞表面高度表达 GD2 神经节苷脂肿瘤抗原和静脉注射肿瘤细胞后肝脏肿瘤的形成方面，RMA-S 淋巴瘤与 EL-4 是相似的。然而，虽然 RMA-S 和 EL-4 对抗体依赖性细胞毒性具有相似的敏感程度，但 RMA-S 却能完全抵抗补体依赖性细胞毒性。RMA-S 与 EL-4 的不同之处还在于正常 C57BL/6 小鼠血清中含有 RMA-S 的天然抗体，这种天然抗体通过体内的免疫球蛋白 G 和 C3 调理肿瘤的生长，不同之处还在于 RMA-S 在加载 I 型 MHC 的肽方面存在着缺陷，因此可以避免肿瘤细胞被 CD8⁺细胞毒性 T 细胞所识别。

即使是在注射肿瘤细胞 5 天后开始治疗，静脉注射 RMA-S 产生的肝脏肿瘤只能使小鼠在单克隆抗体治疗下存活 2 星期。虽然使用单克隆抗体进行的单一疗法的确可以改善小鼠的存活情况，但只有在 β -葡聚糖和单克隆抗体联合使用的情况下才能使小鼠在没有肿瘤的状态下长期存活。

β -葡聚糖和抗肿瘤单克隆抗体的联合使用能够明显加强 Balb/c 或 C57BL/6 小鼠体内另外 4 种肿瘤模型的退化。这一疗治要成功地使小鼠长期存活还要依靠肿瘤抗原的密度和稳定性。肿瘤逃逸的特点是失去了肿瘤抗原，从而导致肿瘤细胞缺乏和自身结合的 iC3b，而经过 β -葡聚糖启动的 CR3 识别肿瘤细胞需要这些已经结合 iC3b。当 GD2 肿瘤抗原是 14.G2a 单克隆抗体的靶目

标时, PMA-S-MUC1 肿瘤模型中有 80%得以长期存活, 但当 MUC1 是 BCP8 单克隆抗体的靶目标时, 长期存活率只有 20%。对逃过 BCP8 和 β -葡聚糖联合疗法的肿瘤所进行的检查表明, 25%以下的肿瘤细胞继续表达 MUC1 并带有膜 iC3b。这对于瞄准人类肿瘤细胞上的 MUC1 而言并不构成一个问题, 因为 MUC1 通常是过量表达的, 并且是稳定的。特别令人感兴趣的是, 抗 MUC1 单克隆抗体单一疗法对肿瘤的生长速度以及带有转染路易氏肺癌 MUC1 的小鼠的存活期没有影响, 然而当 BCP8 与 β -葡聚糖联合使用时, 该疗法可以使肿瘤明显地退化, 并使患肿瘤的小鼠长期存活 (图 21 和图 22)。

以前有关使用 β -葡聚糖但不同时使用单克隆抗体疗法导致肿瘤退化的研究报告表明, β -葡聚糖所介导的肿瘤退化需要 Balb/c 肿瘤模型中存在 CR3, 129/J 肿瘤模型中存在血清 C3 (见 Yan J.等人在《免疫学》上发表的文章, 163: 3045-3052 (1999))。该研究证实, 在针对肿瘤退化和长期无肿瘤存活进行实验时, 在 β -葡聚糖强化单克隆抗体对 C57BL/6 小鼠的疗效方面 CR3 和 C3 具有相似的作用。

除 CR3 外, 还有报道称存在一种特殊类型的巨噬细胞 β -葡聚糖受体, 这种受体被称为 Dectin-1 (见 Brown G. D.等人在《实验医学》上发表的文章, 196: 407-412 (2002))。Dectin-1 可在巯基乙酸盐诱导的腹膜巨噬细胞上被高度地表达, 而在驻留型腹膜巨噬细胞或粒性白细胞上 Dectin 的数量更少, 在天然杀伤细胞上没有发现 Dectin-1 (见 Taylor P. R.等人在《免疫学》上发表的文章, 169: 3876-3882 (2002))。当前的研究并不排除 Dectin-1 的功能, 但当前的研究表明粒性白细胞 CR3 是绝对需要的。不缺乏 CR3 的野生型粒性白细胞可以与 β -葡聚糖相结合, 这表明在鼠源性粒性白细胞上 CR3 是可溶性单链 β -葡聚糖的主要受体

(见 Xia Y.等人在《免疫学》上发表的文章, 162: 2281-2290 (1999))。CR3 不仅对粒性白细胞识别可溶性 β -葡聚糖是需要的, 而且对触发针对肿瘤细胞的细胞毒性也是需要的, 其中的肿瘤被 CR3 目标配体 iC3b 所包裹。

以前进行的体外实验表明, 可溶性 β -葡聚糖能够启动巨噬细胞、中性粒细胞和天然杀伤细胞的 CR3, 从而产生对 iC3b 包裹的肿瘤细胞产生细胞毒性 (Vetvicka V.等人在《临床研究》上发表的文章, 98: 50-61, 1996; 见 Vetvicka V.等人在《免疫学》上发表的文章, 159: 599-605 (1997))。当前的研究表明, 粒性白细胞在 β -葡聚糖介导的体内肿瘤退化过程中发挥着基础作用。粒性白细胞由肿瘤补充, 与单克隆抗体和 β -葡聚糖疗法无关, 这也许是因为肿瘤内补体被天然抗体所激活, 补体的激活会释放出强力的趋化因子 C5a。对肿瘤细胞悬浮液所进行的流式细胞测定分析表明, Gr-1⁺粒性白细胞是肿瘤内主要的 CR3⁺白细胞类型, 抗 Gr-1 单克隆抗体对粒性白细胞的消耗证明粒性白细胞在 β -葡聚糖介导的肿瘤退化过程中起着主要的作用。

一个意外的发现是, 粒性白细胞在肿瘤退化过程中所发挥的作用似乎与单克隆抗体和 β -葡聚糖疗法无关。在缺乏粒性白细胞的小鼠体内, 肿瘤的生长速度明显快于肿瘤在未接受治疗的对比组小鼠体内的生长速度。鉴于患有肿瘤且未接受治疗的小鼠体内白细胞的数量增多, 这些补充的粒性白细胞似乎有能力通过 C3 受体加强抗体依赖型细胞介导的细胞毒性来杀灭经天然抗体和 iC3b 调理过的肿瘤细胞, 因为某些天然抗肿瘤抗体是免疫球蛋白 G (见 Yan J.等人在《免疫学》上发表的文章, 163: 3045-3052 (1999))。

总之, 本研究表明, 同时使用可溶性葡聚糖 β -葡聚糖可以显著增强抗肿瘤抗体 (比如单克隆抗体) 的疗效。此外, 初步的数

据表明,当可溶性葡聚糖与产生抗肿瘤抗体的肿瘤疫苗联合使用时, β -葡聚糖同样可以增强肿瘤的退化(见 G. D. Ross 未公开的观察结果)。可溶性葡聚糖的功能是补充杀灭肿瘤细胞的粒性白细胞,这一补充过程是通过 CR3 对与肿瘤细胞相结合的 iC3b 的识别而触发的。这是一种新型的抗肿瘤单克隆抗体疗法的效应机理,这种机理可与所有其他单克隆抗体介导的肿瘤退化机理形成累加效应。正如使用 BCP8 抗 MUC1 单克隆抗体治疗 LL/2-MUC1 肿瘤所表明的,即使在单独使用单克隆抗体对肿瘤没有实际疗效的情况下, β -葡聚糖也能使肿瘤出现明显的退化,并可使肿瘤宿主长期存活。以前所报道的可溶性葡聚糖在癌症患者中出现的活性不一致情况被认为可能是由于存在不同的天然抗体或诱导出的抗肿瘤抗体所导致的。当前的研究表明,如果与单克隆抗体联合使用时可溶性葡聚糖可产生更一致的杀灭肿瘤反应。由于与可溶性葡聚糖有关的副作用很少出现,所以在肿瘤抗体疗法中使用 β -葡聚糖是一种有益的做法。

实例 3

口服大麦 β -葡聚糖所导致的肿瘤退化和存活情况改善与静脉注射 β -葡聚糖的情况相似。正如在以上“材料和方法”一节中所述的,在 C57BL/6 小鼠的皮下植入 RMA-S-MUC1 肿瘤细胞,植入 5 天后有肿瘤形成,此时通过单独静脉注射抗 GD2 神经节苷脂的 14.G2a 单克隆抗体进行治疗,或在同时静脉注射可溶性酵母 β -葡聚糖或口服大麦 β -葡聚糖的条件下进行治疗。图 26 表明了治疗结果。图 26 表明了平均值 \pm 标准偏差。

虽然本发明是结合优选实施方案而进行具体说明的,但本领域技术人员应该理解的是,在不脱离本文所附权利要求所限本发明范围的前提下,可以在形式和细节上对本发明进行各种修改。

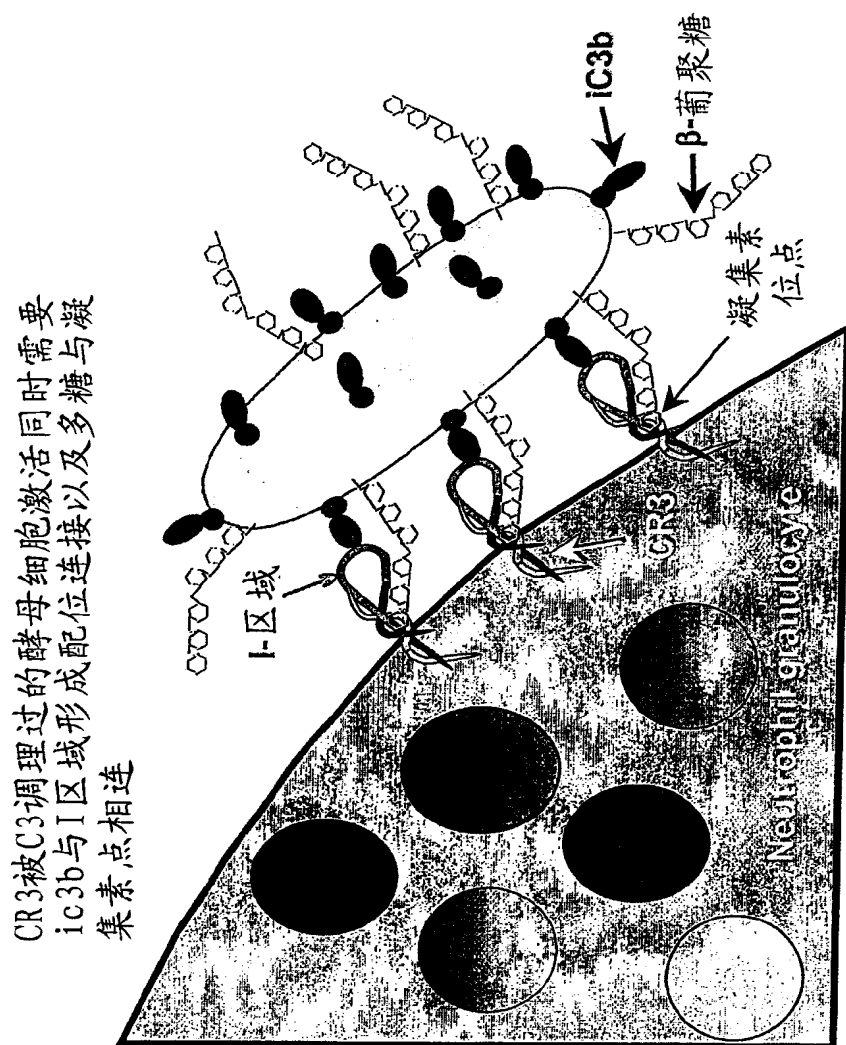


图 1

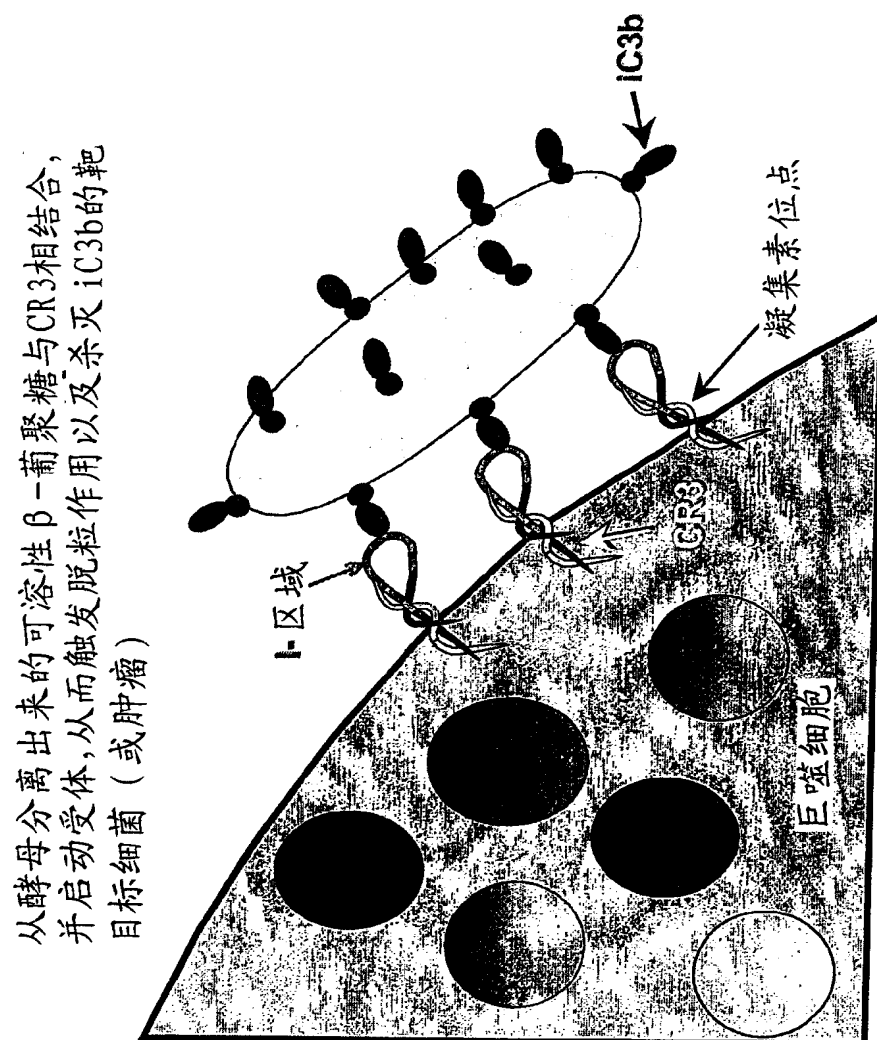


图2

从酵母分离出来的可溶性 β -葡聚糖与CR3相结合，
并启动受体，从而触发脱粒作用以及杀灭iC3b的
靶目标细菌(或肿瘤)

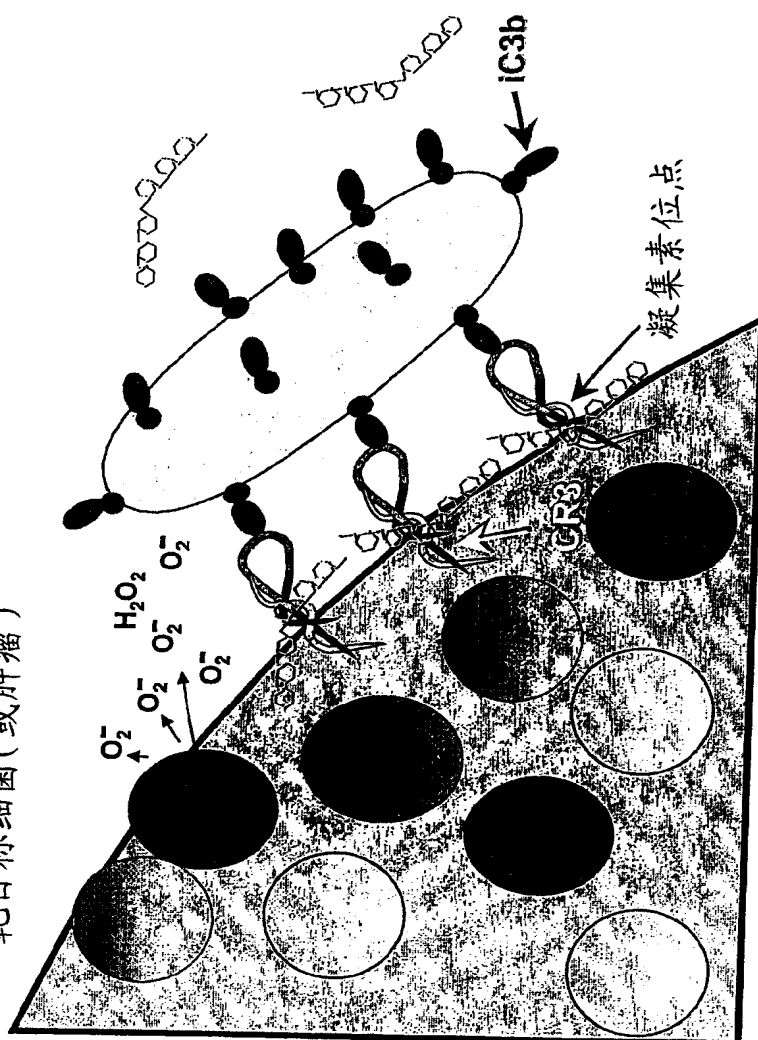


图 3

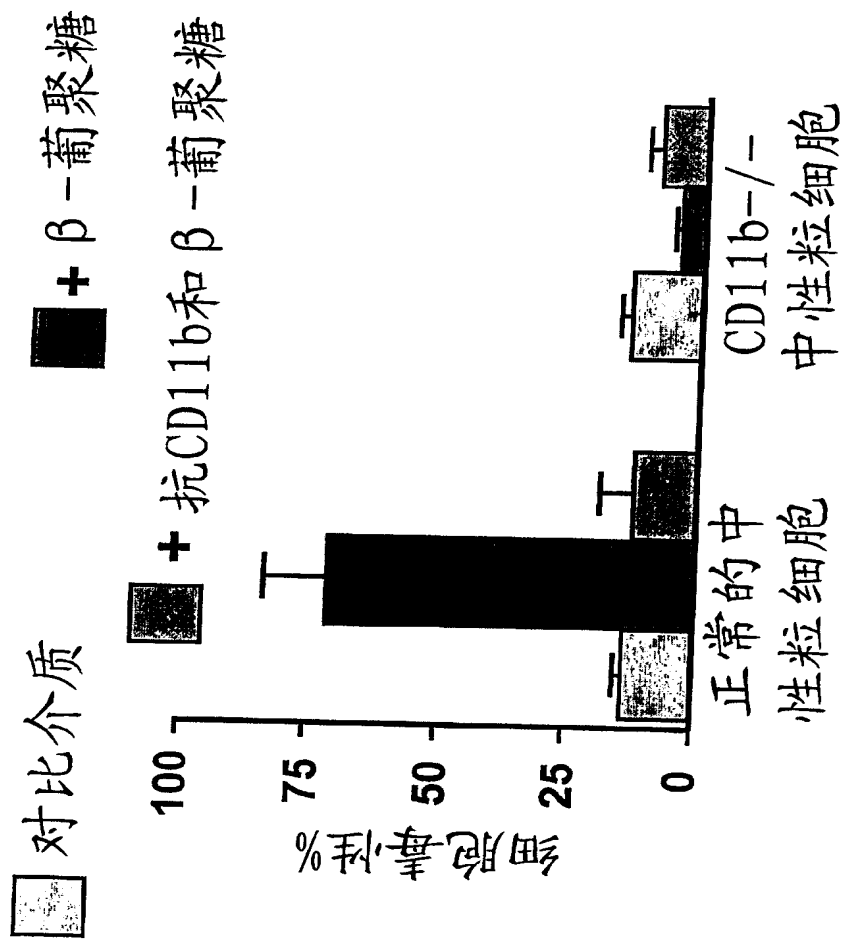
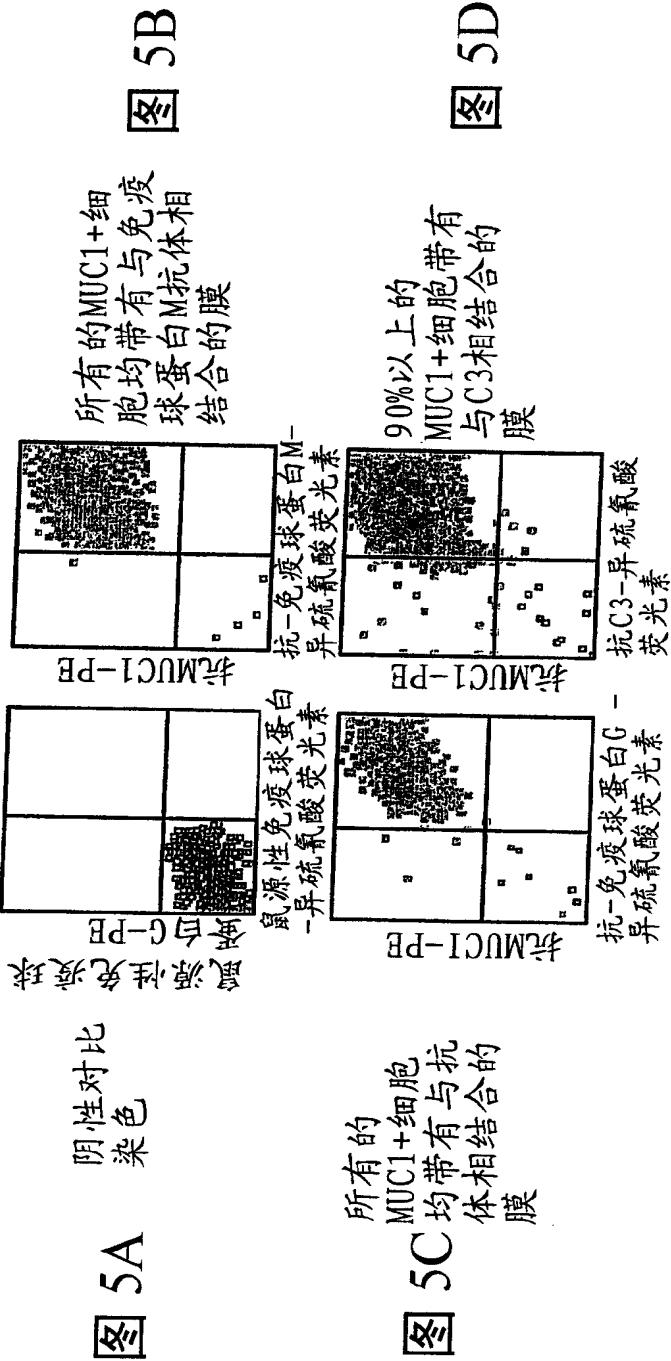


图4

使用双色流式细胞测定仪对取自患乳腺癌小鼠的肿瘤细胞进行免疫球蛋白M、免疫球蛋白G或C3分析



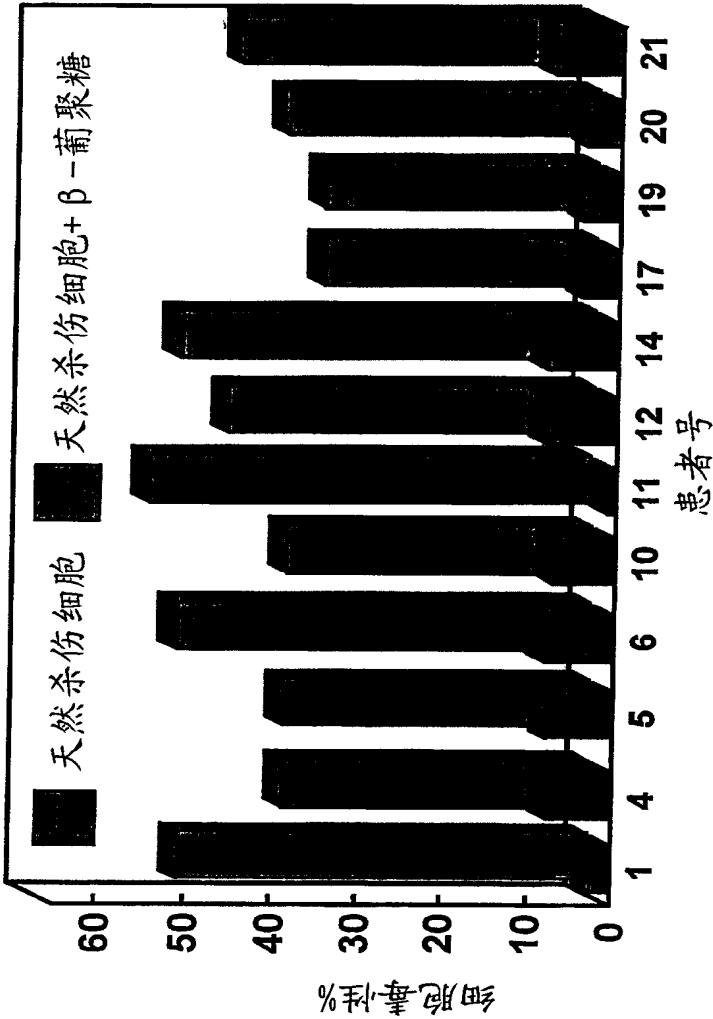


图 6

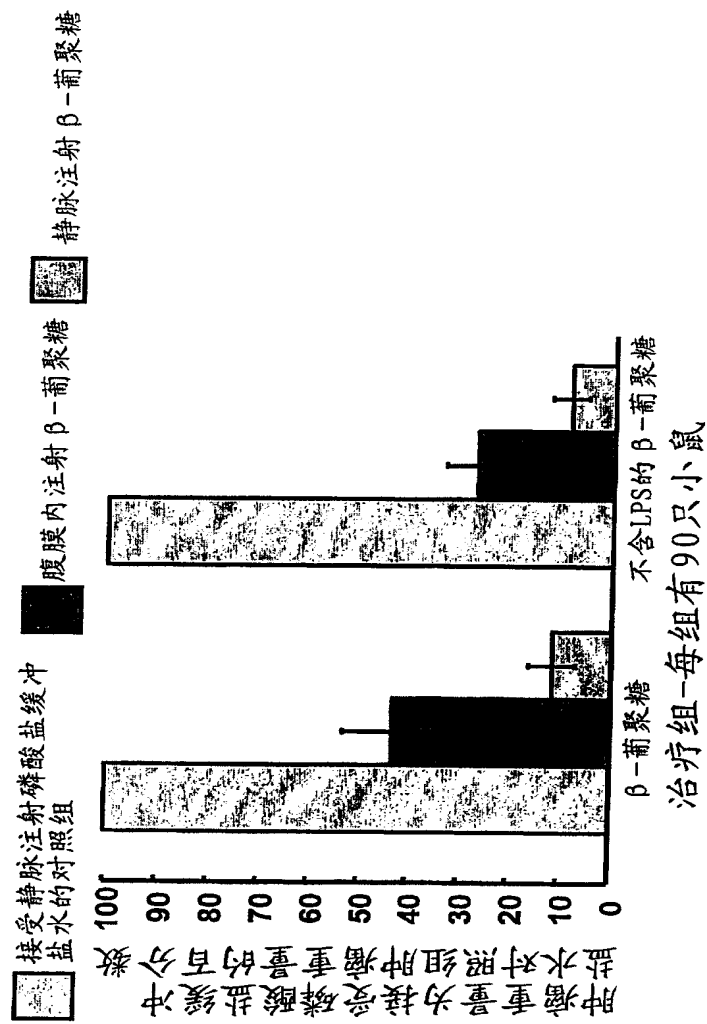


图7

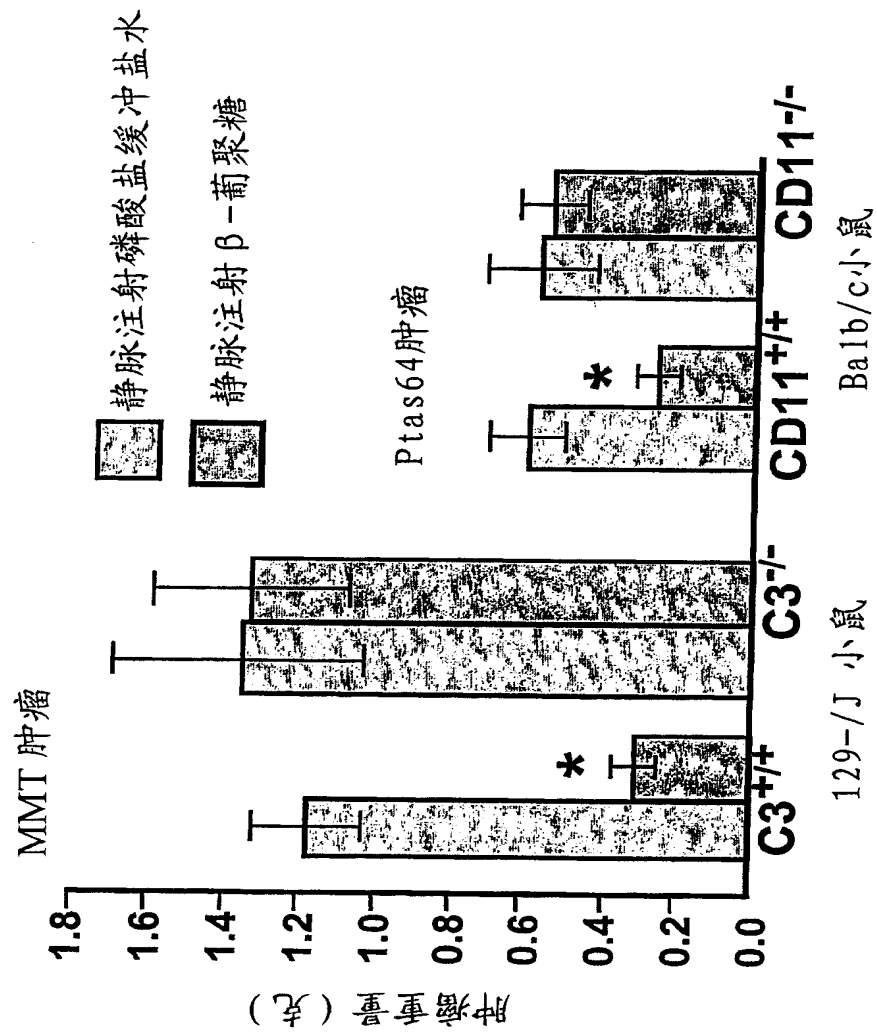
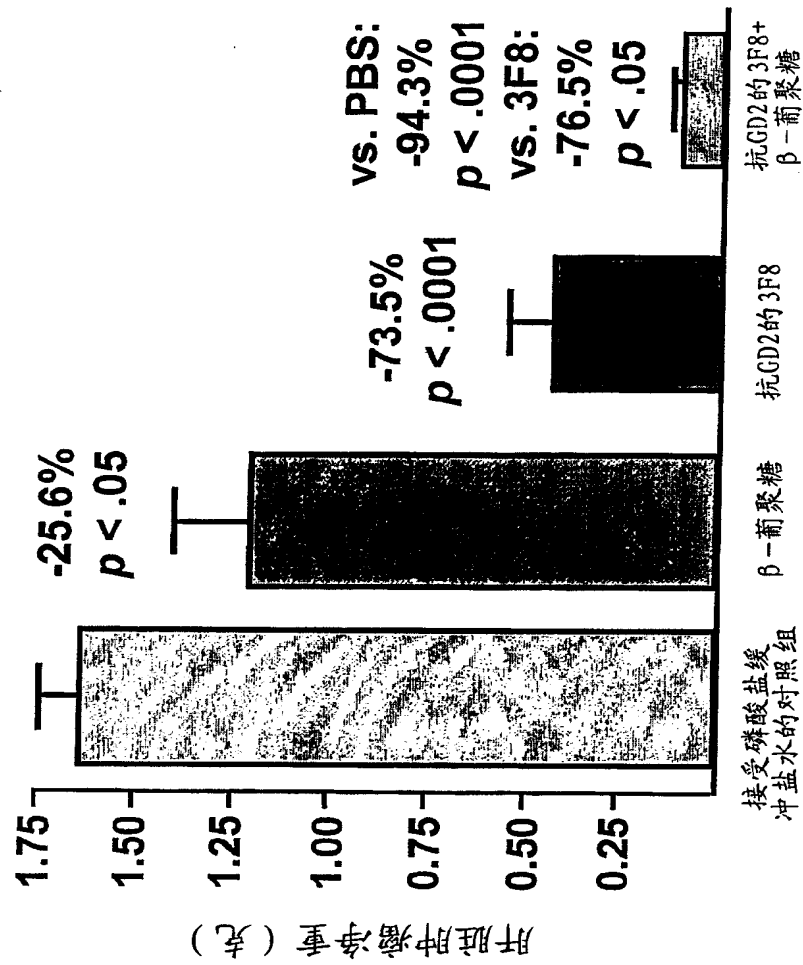


图 8



治疗组 (每组有6只小鼠)

图 9

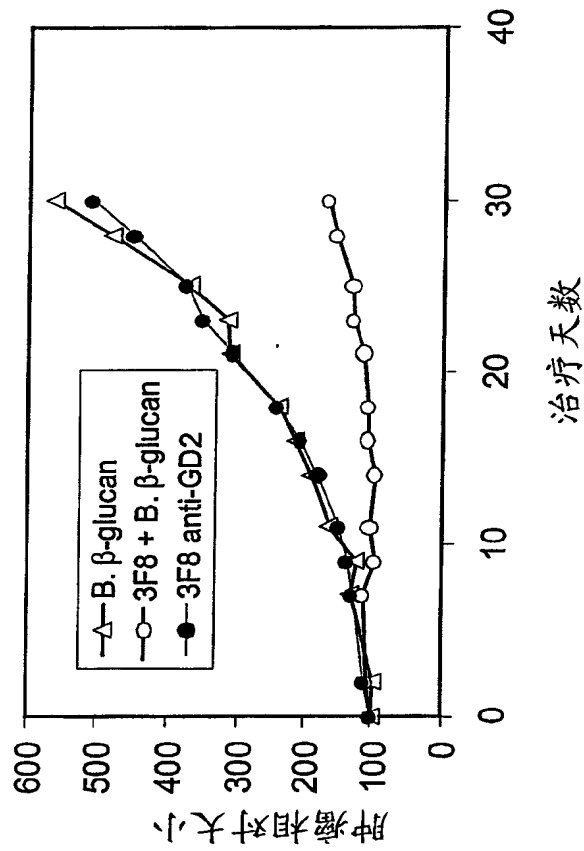


图10

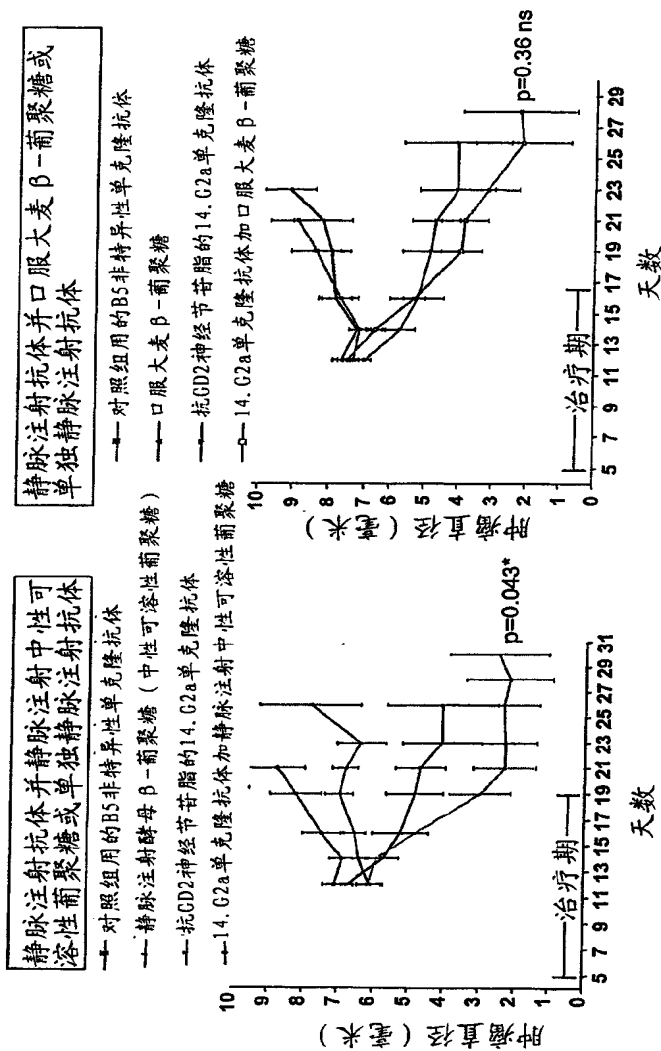


图11A

图11B

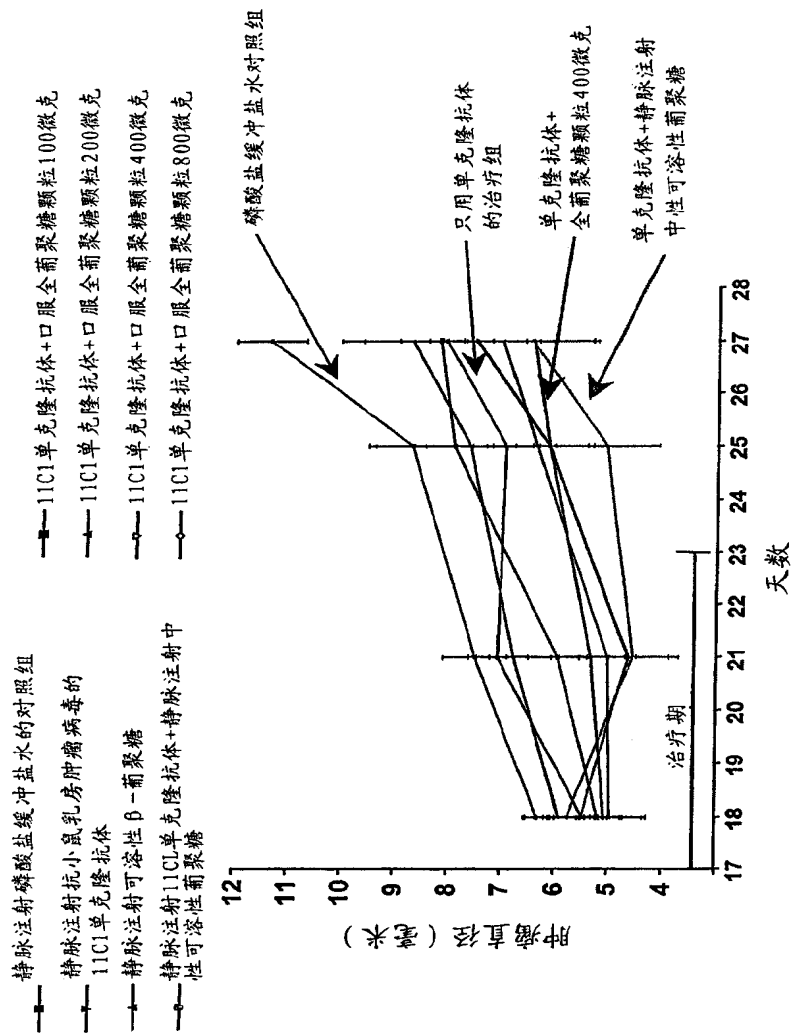


图12

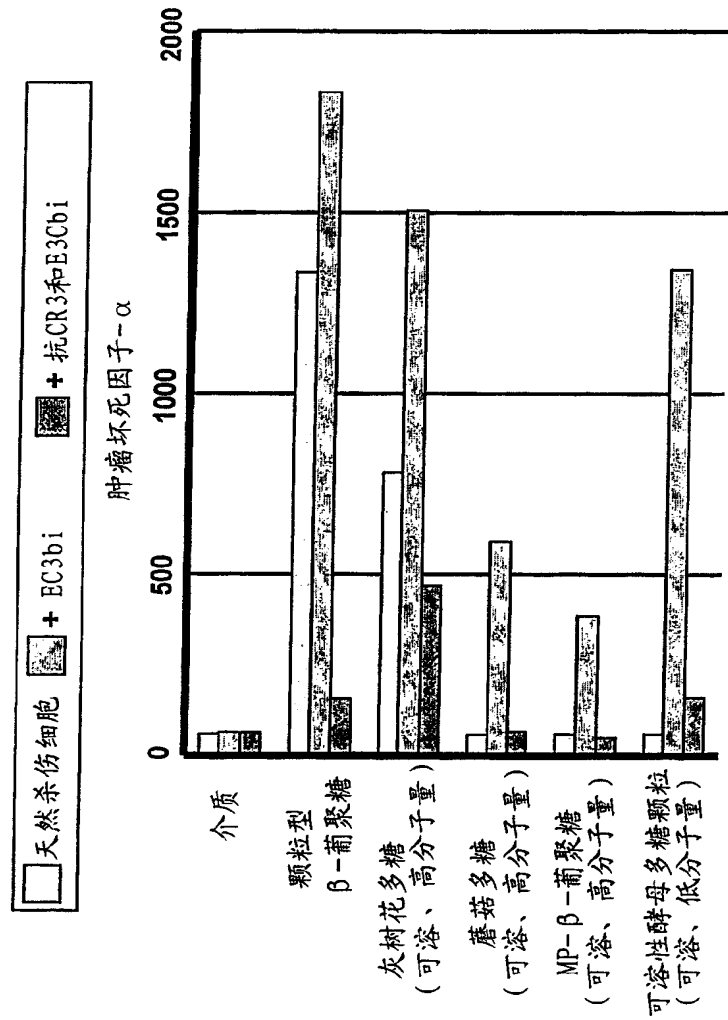


图13

针对细胞质IL-4而对血液CD4+T细胞进行荧光染色

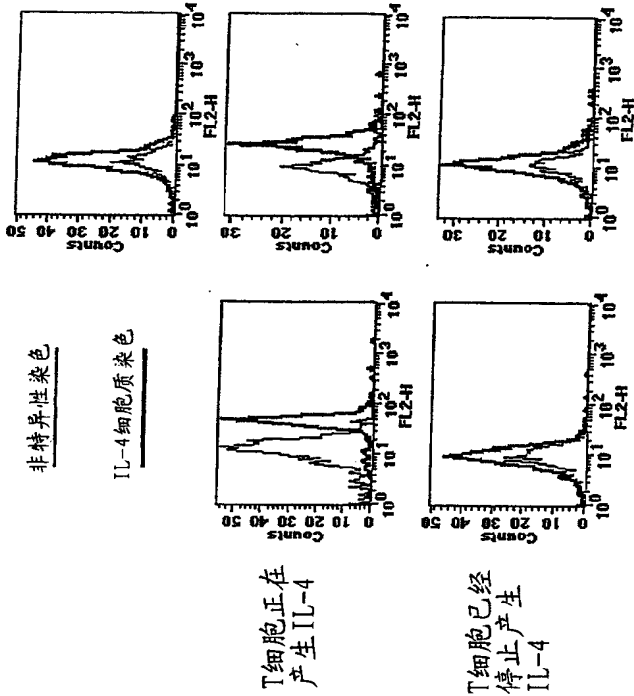


图14A

来自患有肿瘤的正常Balb/c小鼠的血液

图14B

T细胞正在产生IL-4

图14C

在植入乳腺肿瘤细胞后12天从2只Balb/c小鼠体内采集的血液

图14D

T细胞已经停止产生IL-4

图14E

在植入乳腺肿瘤细胞后12天从2只Balb/c小鼠体内采集的血液和开始每天口服全葡聚糖颗粒治疗2天后从Balb/c小鼠体内采集的血液

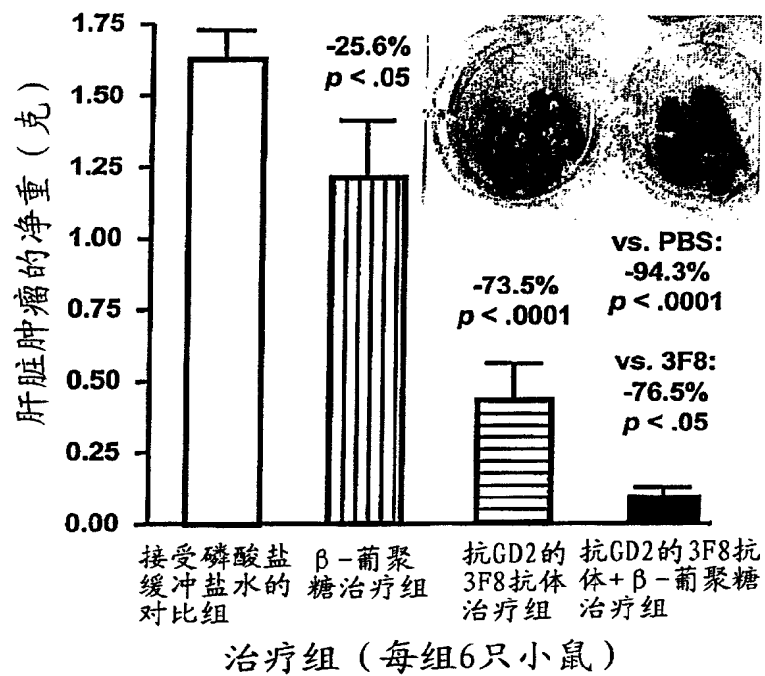


图 15

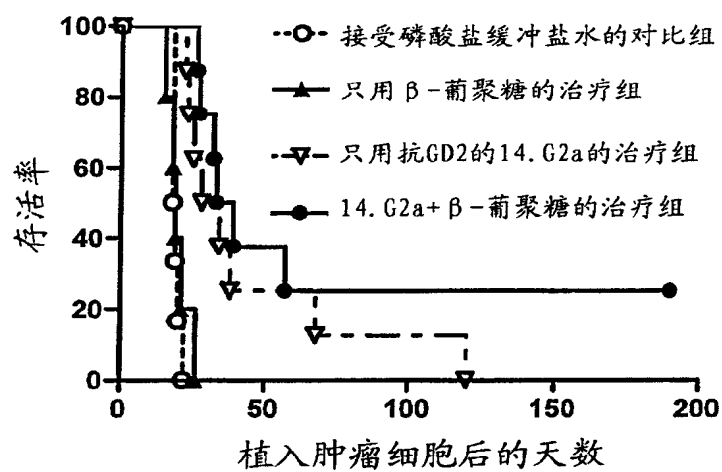


图 16

图 17A

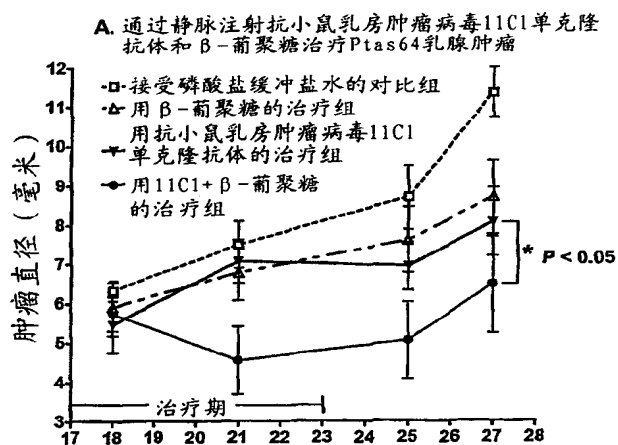


图 17B

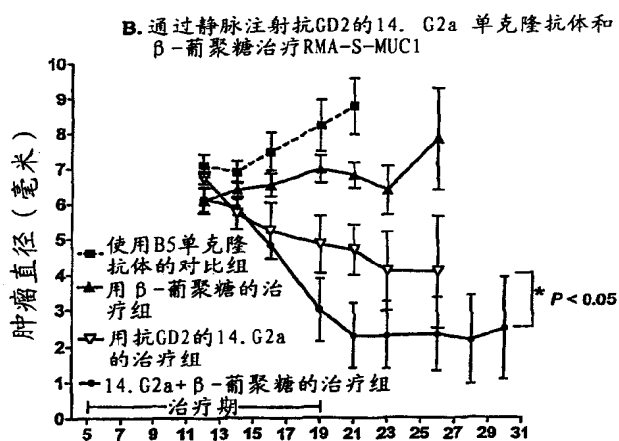


图 17C

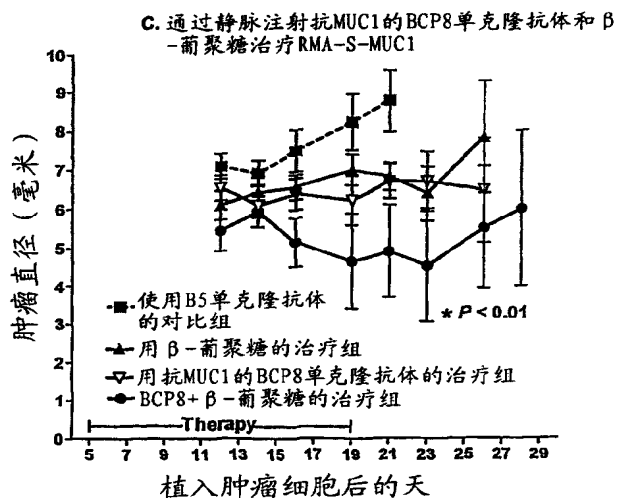


图 18A

A. 通过静脉注射抗小鼠乳房肿瘤病毒11C1单克隆抗体和 β -葡聚糖治疗Ptas64乳腺肿瘤

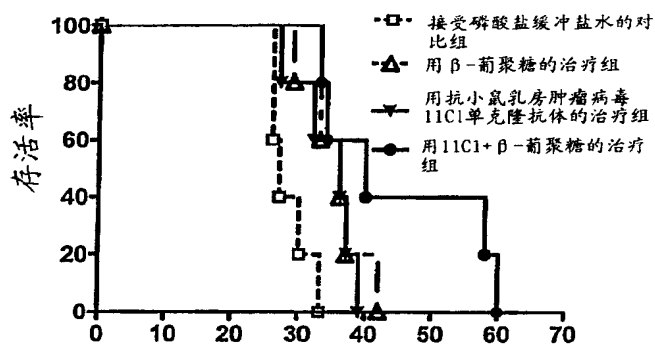


图 18B

B. 通过静脉注射抗GD2的14. G2a 单克隆抗体和 β -葡聚糖治疗RMA-S-MUC1

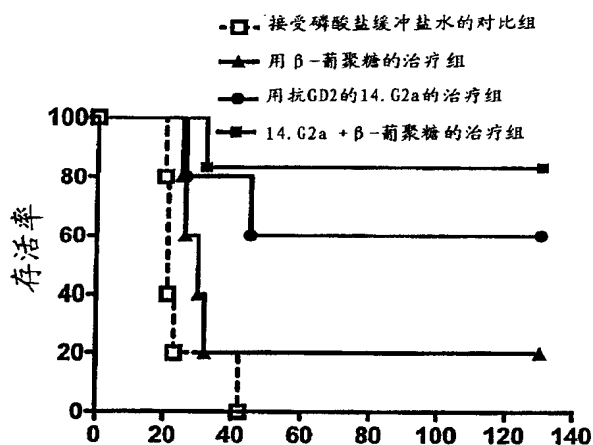
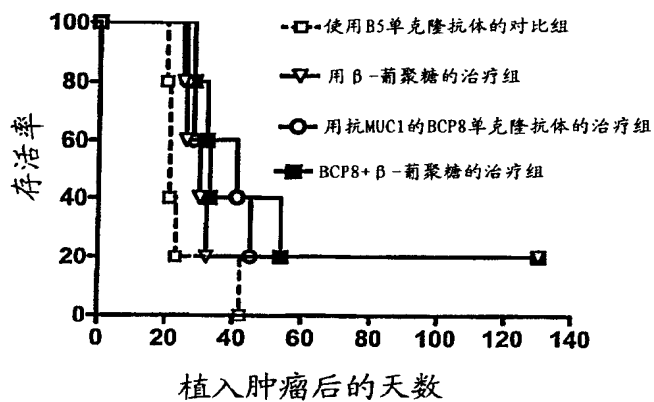


图 18C

C. 通过静脉注射抗MUC1的BCP8单克隆抗体和 β -葡聚糖治疗RMA-S-MUC1



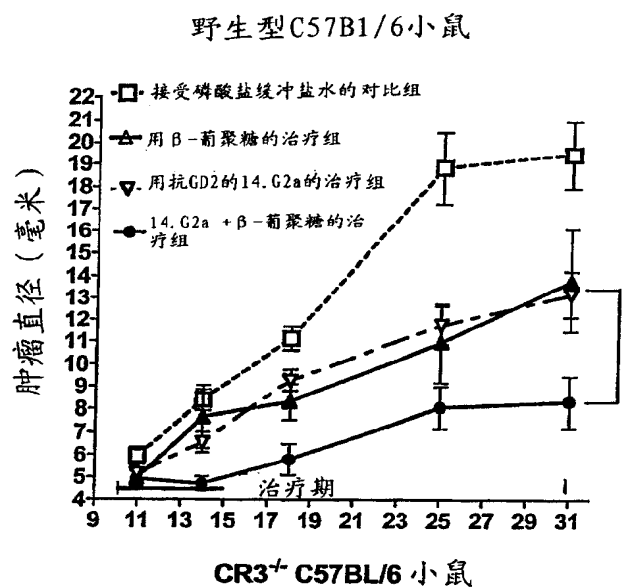


图 19A

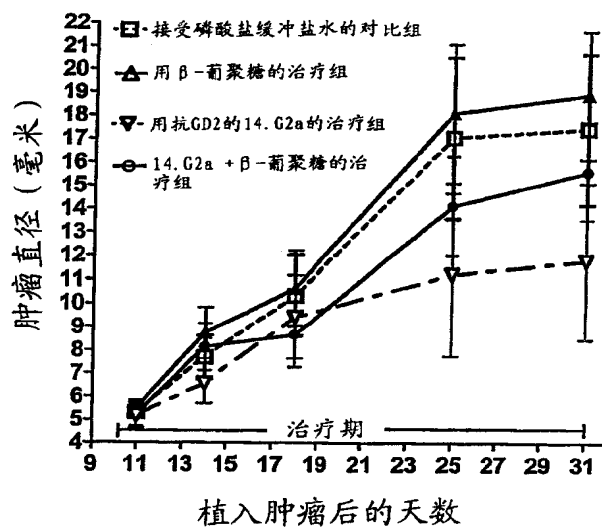


图 19B

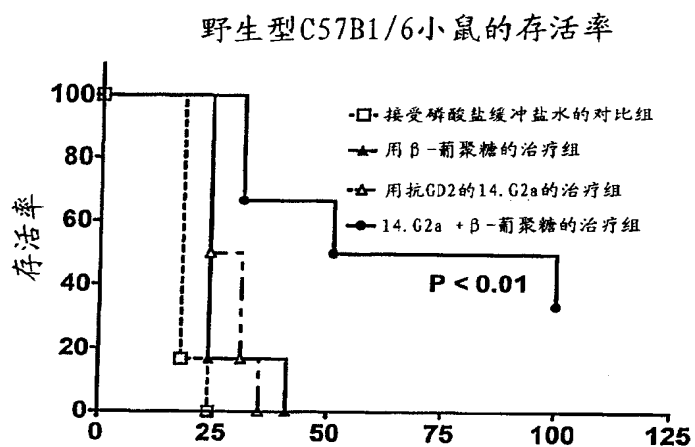


图20A

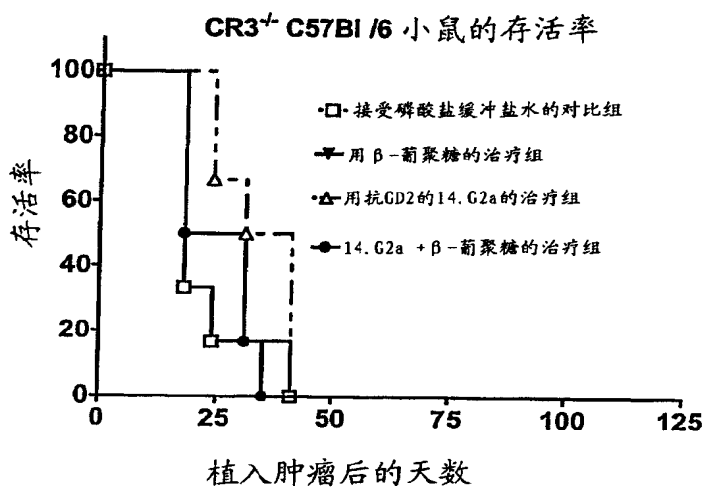


图20B

图 21A

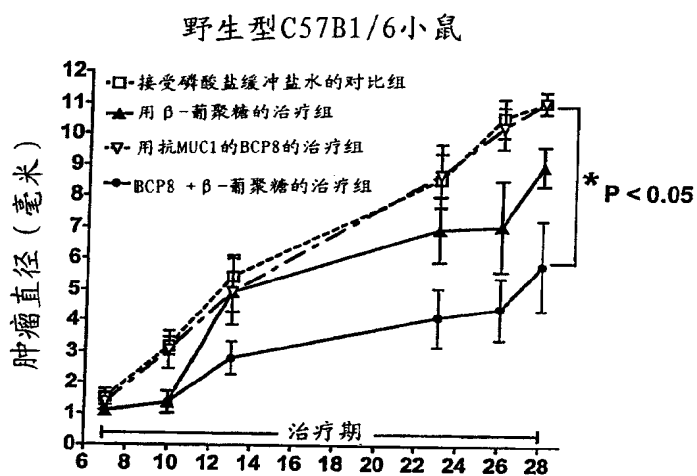
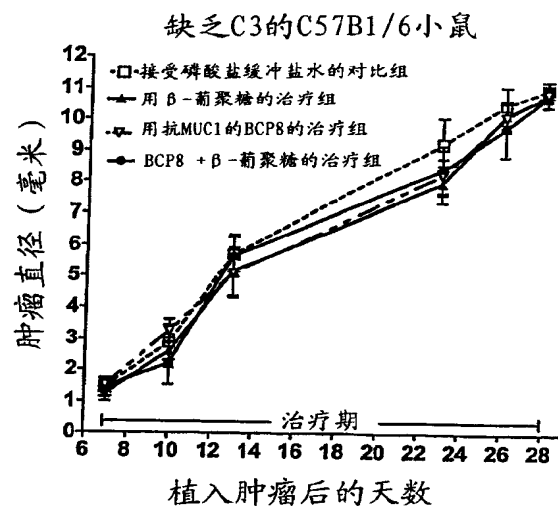


图 21B



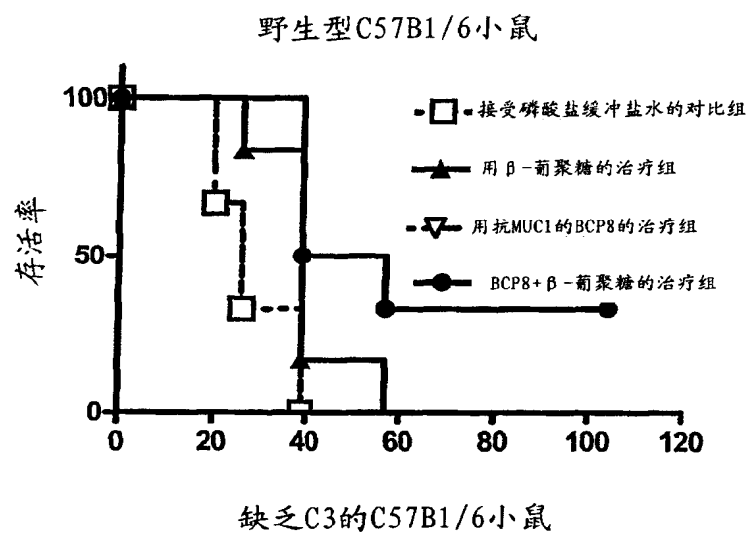


图 22A

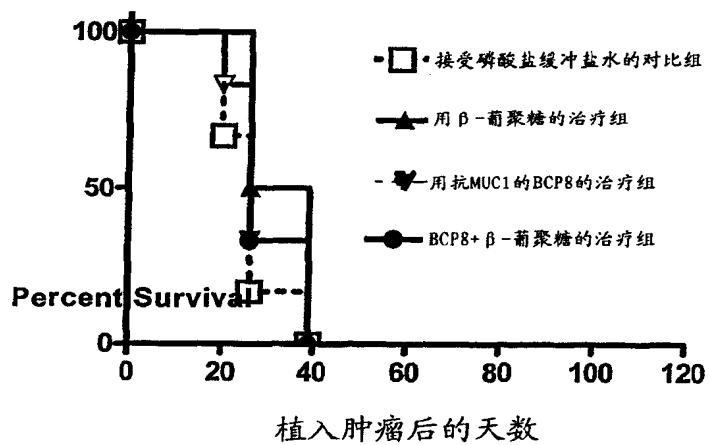


图 22B

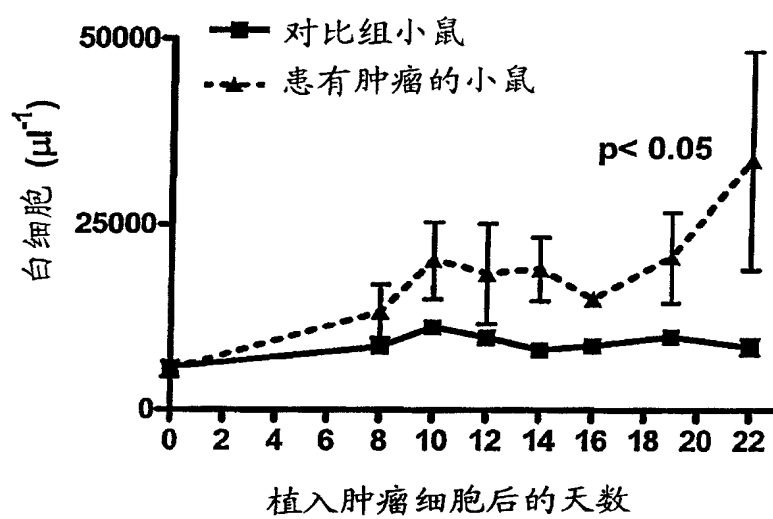
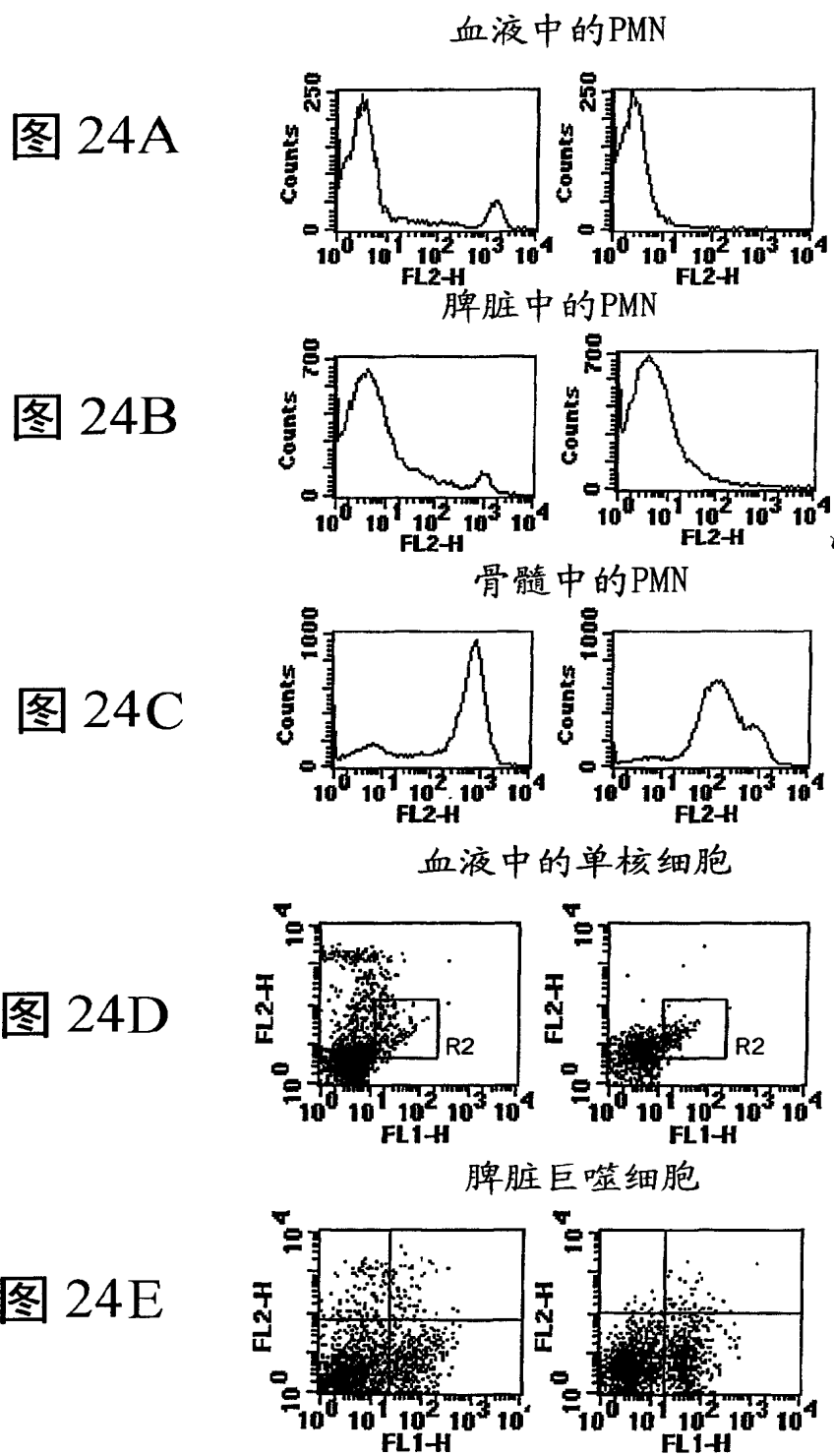


图 23



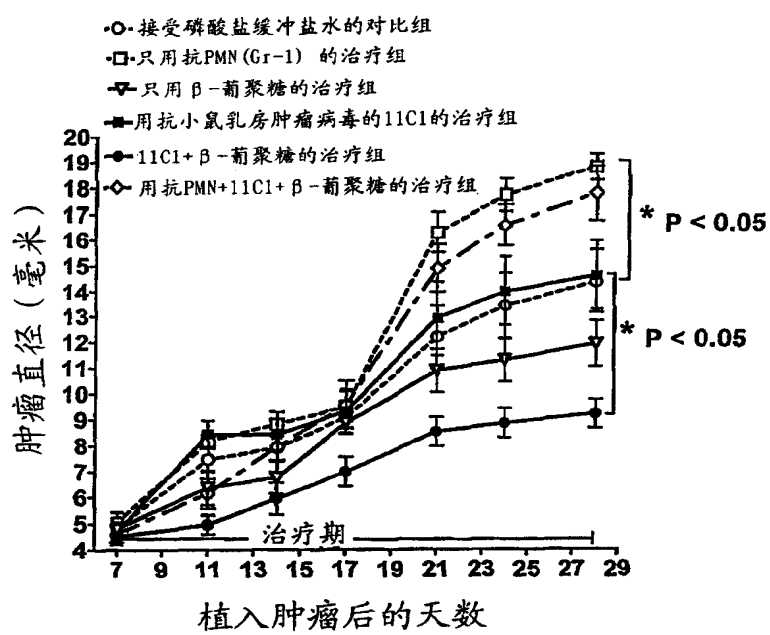


图 25

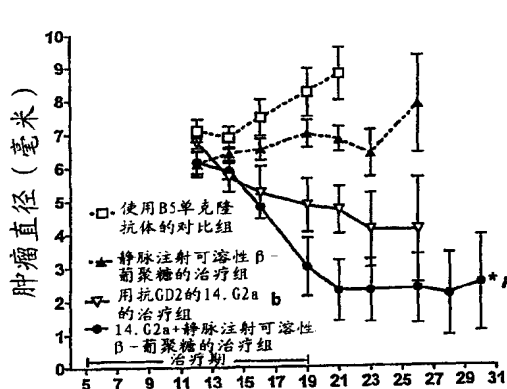


图 26A

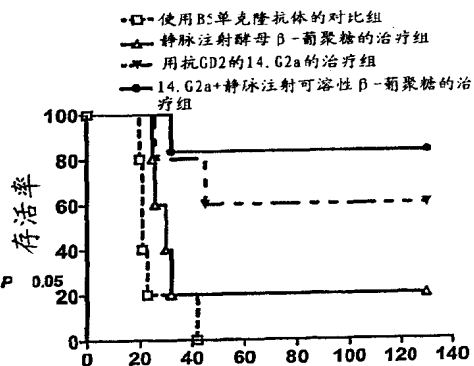


图 26B

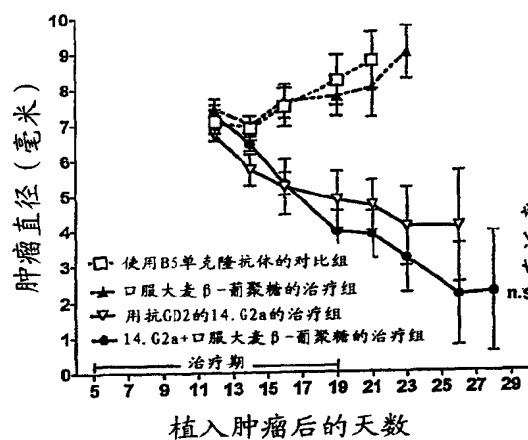


图 26C

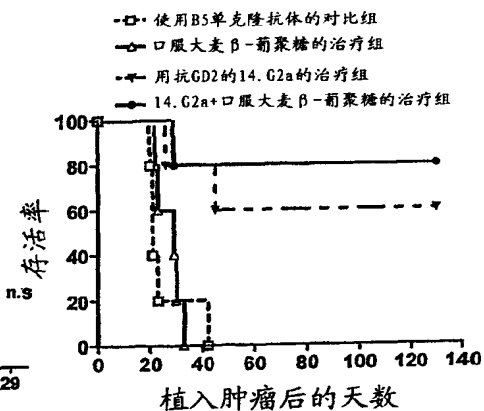


图 26D